

КЛИНИЧЕСКАЯ ФЕРМЕНТОЛОГИЯ

ПОД РЕДАКЦИЕЙ

ПРОФ. Д-РА ЭДУАРДА ШЕКЛИКА

ВАРШАВА 1966

ПОЛЬСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО

КЛИНИЧЕСКАЯ Ф

КЛИНИЧЕСКАЯ ФЕРМЕНТОЛОГИЯ

ENZYMOLOGIA KLINICZNA

POD REDAKCJA

PROF. DRA E. SZCZEKLIKA

WSPÓLAUTORZY

PROF. DR T. BARANOWSKI, PROF. DR K. GIBIŃSKI, DR F. KOKOT,
DOC. DR S. ŁUKASIK, DR S. NOWAK, DOC. DR M. ORŁOWSKI,
DOC. DR K. SPETT, PROF. DR E. SZCZEKLIK



WARSZAWA 1966

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH

КЛИНИЧЕСКАЯ ФЕРМЕНТОЛОГИЯ

ПОД РЕДАКЦИЕЙ
ПРОФ. Д-РА Э. ЩЕКЛИКА

СОАВТОРЫ

ПРОФ. Д-Р Т. БАРАНОВСКИ, ПРОФ. Д-Р К. ГИБИНЬСКИ, Д-Р Ф. КОКОТ,
ДОЦ. Д-Р С. ЛУКАСИК, Д-Р С. НОВАК, ДОЦ. Д-Р М. ОРЛОВСКИ,
ДОЦ. Д-Р К. ШПЕТТ, ПРОФ. Д-Р Э. ЩЕКЛИК



ВАРШАВА 1966

ПОЛЬСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО

Оригинал:
ENZYMOLOGIA KLINICZNA

Перевод с польского:

Д-р Р. М. Лозовская

и

Д-р Н. А. Трахтенгерц

Научный редактор:

Проф. М. Ф. Меркулов

Редактор:

Коллектив

Технический редактор:

Е. Белецки

Корректор:

В. Вавжиновска

ПОЛЬСКОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ МЕДИЦИНСКОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО — ВАРШАВА 1966

Сдано в набор 2. 6. 1965 г. Подписано к печати 25. 6. 1966 г. Формат бумаги 70 × 100/16.

Издат. листов 46,2. Печат. л. 33,0. Тираж 3.000 + 205 экз.

НАРОДНАЯ ТИПОГРАФИЯ — КРАКОВ

Цена 5 р. 84 к.

ВВЕДЕНИЕ

Последние данные исследований жизненных процессов, заставляют думать, что главную роль в них играют ферменты. Жизнь — это стройное течение многих тысяч химических реакций, направление и скорость которых определяют специфические катализаторы, свойственные исключительно живым организмам. Название катализаторов энзимы происходит от греческих слов *en zyme*, т.е. „в дрожжах“. Это название ввел в 1878 году Kühne для того, чтобы разграничить два, по его мнению, разных понятия: более широкое — катализатор, т.е. вещество, производимое разными клетками, от более узкого понятия фермент, т.е. вещество, принимающее участие в механизме спиртового брожения.

Первоначально слово фермент относилось к термолабильному веществу диастазе, изолированной при осаждении спиртом солодового экстракта (1). Это вещество осаживало крахмал.

Kirchhoff (1814) (2), наблюдавший этот процесс раньше, назвал указанное вещество амилазой. С тех пор названия ферментам дают по названию веществ, с которыми они взаимодействуют. К названию субстрата ферментативной реакции прибавляют окончание — аза.

Ферменты, как правило, отличаются термолабильностью. Они также чувствительны к влияниям кислот, щелочей, органических растворителей и ионов тяжелых металлов. Растяжение растворов ферментов в тонкие плёнки (например при вспенивании раствора) вызывает потерю ферментативной активности.

Эти свойства отличают ферменты от других компонентов живых клеток. Свойства ферментов, выявленные при очистке, указывают на их белковую природу.

Изучение химического строения компонентов живой материи выявило еще одно важное свойство ферментов — их специфичность. Emil Fischer (3) в 1894 году сравнил это свойство с замком и подходящим к нему ключом. Фермент активен только по отношению к одному, определенному веществу. Если существуют пространственные изомеры этого вещества (например оптические), то он проявляет активность только по отношению к одному из них. В этом заключается основная разница между простыми катализаторами и биокатализаторами.

Прогресс современной энзимологии является результатом большого комплекса работ по изолированию, очистке и определению химического строения ферментов. Систематическую очистку ферментов начал Wilstätter (1922) (4), применявший для этой цели абсорбционные методы. Получение Sumner (1926) (5) кристаллической уреазы было большим достижением в области очистки ферментов. Кристаллизация протеолитических ферментов из пищеварительных соков: пепсина (6), трипсина и химотрипсина (7), осуществленная Northrop и сотр. в тридцатых годах, создала возможность изучать химическую структуру чистых биокатализаторов. Первые тканевые ферменты были получены в кристаллической форме в 1937 году Sumner и Dounce (каталаза печени) и Baranowski (7a, 8) (альдолаза и глицеральдегидфосфатдегидрогеназа кро-

личьей мышцы). Фракционирование белков хроматографическими и электрофоретическими методами позволило изолировать гомогенные вещества, что значительно повысило точность химической идентификации ферментов.

История исследований механизма каталитической активности коротка, но знаменательна. Необходимость присутствия в системе низкомолекулярного, термостабильного соединения доказал еще в 1906 году Harden-Young, при изучении спиртового брожения (9). Изолирование из очищенного желтого фермента лактофлавинфосфорной кислоты (Warburg и Christian, 10), и восстановление ферментативной активности неактивного фермента путем добавления упомянутого соединения (Warburg и Christian, 1933 год) положили основу исследованиям в области связи между химическим строением ферментов и их каталитической активностью. Были введены понятия апофермента и кофермента. Неаминокислотная или простетическая группа каталитически активного белка часто обуславливает каталитическую активность. Большинство простетических групп ферментов оказались тождественными или весьма близкими витаминам. Это пролило свет на роль витаминов в организме.

Большое значение для понимания механизма ферментативного катализа имеют исследования кинетики ферментативных реакций, начало которым было положено Michaelis и Menten (11) в 1913 году. Классическое понятие катализатора, установленное Olwald, нуждалось в пересмотре. Путем анализа кинетики ферментативных реакций было доказано существование промежуточного комплекса фермент-субстрат. В последнее время удалось в немногих случаях изолировать и идентифицировать промежуточный комплекс. Химическими методами было доказано наличие каталитических центров в ферментах. Изотопная техника позволила пометить в молекуле фермента участки, в которых протекает активация субстрата реакции. Методы разделения белков стали в настоящее время настолько тонкими, что с их помощью удастся дифференцировать ферменты с одинаковой активностью, но с небольшими различиями в химическом строении. Благодаря этим методам удалось обнаружить изоферменты (16a), т.е. ферменты различные по структуре, но катализирующие одни и те же реакции в разных тканях.

Изучение роли ферментов в настоящее время охватило также вопросы генетики. Работы в области биохимической генетики, начатые Beadle и Tatum (12) и блестяще развернутые современными биохимиками-генетиками, выяснили отношение генов к метаболизму. Была создана теория, известная под названием „один ген — один фермент“. Согласно этой теории, биосинтез индивидуальных ферментов обусловлен наличием определенных генов в наследственном веществе. Процессы передачи наследственных признаков при сохранении вида происходят с участием генов, инструментом которых служат ферменты. Эта теория объяснила сущность патологических состояний, которые можно рассматривать, как генетически обусловленные ферментные дефекты метаболизма. Наряду с использованием определения ферментативной активности для нужд диагностики, это является важнейшим достижением науки о ферментах.

TADEUSZ BARANOWSKI

ПЕРВАЯ ЧАСТЬ
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ИЗ ОБЛАСТИ ХИМИИ
TADEUSZ BARANOWSKI

ФЕРМЕНТЫ

ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

БЕЛКОВЫЕ СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Все обнаруженные до сих пор и изученные в физико-химическом отношении ферменты оказались белками. Основным их признаком является большая молекулярная масса. В химическом отношении они представляют собою полипептидные цепи, состоящие из аминокислот, соединенных пептидной связью. Таким образом ферменты являются линейными полимерами аминокислот.

В большинстве ферментов были обнаружены неаминокислотные группы: сахара, нуклеотиды или пигменты. Они образуют т.н. простетические группы белков, преимущественно связанные с каталитическими свойствами ферментов. Как правило, простетические группы представляют собой низкомолекулярные соединения, составляющие ничтожную долю массы молекулы белка. В последнее время было доказано, что в состав молекулы фермента входят также металлы, стабилизирующие белковые структуры.

Молекулярная масса ферментов. Наука располагает довольно большим числом очищенных и изученных в физико-химическом отношении ферментов. Особенно хорошо изучены такие свойства ферментов, как молекулярная масса, форма молекулы, вязкость растворов и степень гидратации. Главным источником этих данных являются гидродинамические исследования и исследования оптических свойств растворов.

Молекулярная масса ферментов определяется по большей части путем измерения константы седиментации и константы диффузии. Основным оборудованием для этой цели является ультрацентрифуга (13) и диффузионная камера с оптическим прибором для регистрации хода диффузии. Под влиянием скоростного центрифугирования (ускорения порядка нескольких сот тысяч g) молекулы белка в растворе осаждаются в поле центробежной силы с определенной скоростью, которая зависит от молекулярной массы и формы белковых молекул. Каждый род молекул характеризуется коэффициентом седиментации, т.е. скоростью продвижения молекул в поле центробежного ускорения, равном единице. Экстраполируя коэффициенты седиментации, полученные при центрифугировании растворов белка разной концентрации, до бесконечно большого разведения (для исключения влияния растворителя), получают константу седиментации, выраженную в S (Svedberg). Молекулярная масса вычисляется по формуле:

$$M = \frac{RT}{D \left(1 - \frac{r}{b}\right)} \cdot S$$

где R — газовая константа, T — абсолютная температура, D — константа диффузии, ρ — плотность растворителя, v — парциальный удельный объем белка. Можно также определить молекулярную массу путем достижения равновесия между седиментацией белковых молекул и процессом их диффузии, противодействующим седиментации.

Таблица 1

Молекулярные массы некоторых ферментов

Рибонуклеаза	12700
Мурамидаза яичного белка (лизозим).	17000
Папаин	20700
Химотрипсин В	22500
β -химотрипсин	23000
Трипсин	23800
Карбонатгидратаза	30000
Карбоксипептидаза	34300
Пепсин	34500
Пероксидаза хрена	40000
Реннин (сычужный фермент)	40000
α -амилаза поджелудочной железы	45000
Дезоксирибонуклеаза I	63000
Пирофосфатаза	63000
Фосфопируватгидратаза дрожжей	64000
Изоцитратдегидрогеназа миокарда	64000
Липоамиддегидрогеназа (сердце свиньи).	81000
Креатинин-фосфокиназа	81000
Алкогольдегидрогеназа печени	84000
Гексокиназа дрожжей	96000
Лактатдегидрогеназа сердца	135000
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (мышца кролика)	137000
Альдолаза кроличьей мышцы	150000
Альдолаза печени	160000
Фумараза сердца	204000
Каталаза лошадиной печени	225000
Каталаза бактерий	232000
Пируватфосфокиназа	232000
Глюканфосфорилаза печени	237000
Глюканфосфорилаза в мышцы	242000
Каталаза воловьей печени	248000
Ксантиноксидаза молока	290000
Уреаза из соевой муки	480000
Глюканфосфорилаза а мышцы	495000
Аденозинтрифосфатаза (миозин)	650000
L-глутаматдегидрогеназа	1000000

Большинство определений молекулярной массы ферментов основано на седиментационных методах, о которых было сказано выше. Молекулярные массы некоторых ферментов представлены в таблице 1.

Как видно из таблицы, молекулярные массы находятся в пределах от 10000 до миллиона. Многомиллионные массы свойственны т.н. комплексным ферментам (например, пируватоксидаза).

Ферменты с высокими молекулярными массами часто состоят из подъединиц с массой равной половине или четверти основной массы. Это свойство является общим и для белков лишенных ферментных свойств. В строении макромолекул участвуют подъединицы, масса которых обычно не превышает 150000. Это значит, что они состоят не более, чем из 150 аминокислот. Число подъединиц равно количеству индивидуальных пептидных цепей, длина которых определяет массу подъединицы.

Подъединицы соединены слабыми химическими связями, благодаря чему они легко диссоциируют. Это явление часто обратимо, так что обе формы фермента находятся в равновесии. Их можно обнаружить, например, при ультрацентрифугировании, когда они образуют отдельные „зубцы“ оптической записи.

Примером диссоциации фермента на две равные части является пируватфосфокиназа в концентрированном растворе мочевины (14). Другим примером может быть α -химотрипсин, встречающийся главным образом в виде димера, диссоциирующего по мере разбавления.

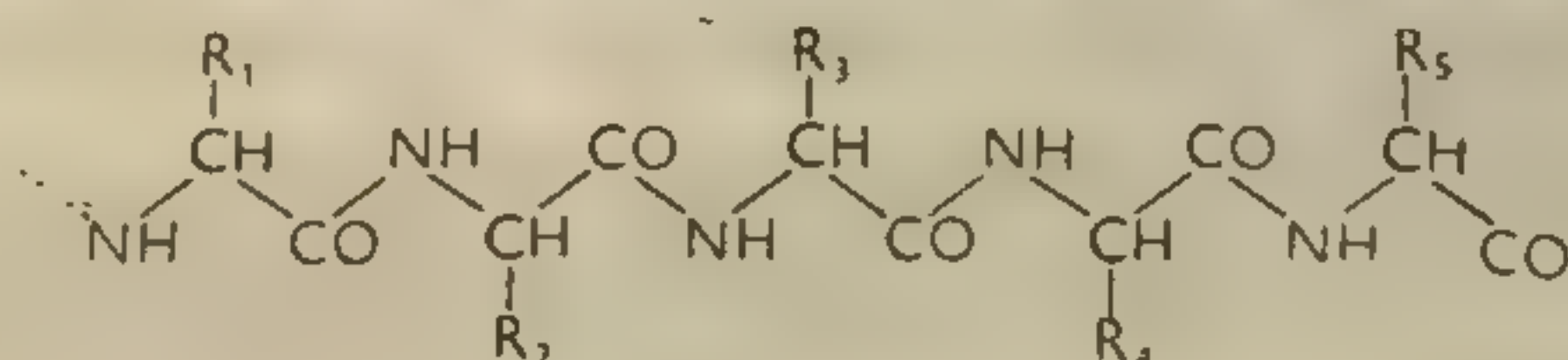
Число пептидных цепей в молекуле белка определяется по методу Sanger (16). Этот метод состоит в прибавлении к слабощелочному раствору белка 1-фтор-2,5-динитробензола (ДНФ). Свободные аминовые группы реагируют с этим соединением, образуя соответствующие динитробензолдериваты (ДНФ-дериваты) тех аминокислот, к которым принадлежат эти аминовые группы. Ввиду того, что в пептидной цепи всегда имеется свободная аминная группа на одном конце пептидной цепи (кроме свободных ϵ -аминовых групп лизина), можно этим способом определить концевую аминокислоту цепи, а также число концевых аминокислот со свободной аминной группой. После воздействия ДНФ белок гидролизуют и аминокислоты разделяют хроматографически. Дериваты ДНФ имеют желтый цвет и занимают определенное место в хроматограмме.

Большинство ферментов, исследованных на содержание концевой группы, оказалось одиночной пептидной цепью. Таковы пепсин, трипсин и папаин. Кристаллическая α -амилаза, рибонуклеаза лизоцим и карбоксипептидаза также обладают только одной N-концевой группой. С другой стороны, α -химозин и альдолаза из мышц кролика имеют две N-концевые аминокислотные группы, и, соответственно, их молекулы состоят из двух пептидных цепей.

Аминокислотный состав ферментов ничем не отличается от такого же состава других белков. Как правило, в них встречаются 18 аминокислот в разных количественных пропорциях, что несколько не влияет на их каталитические функции.

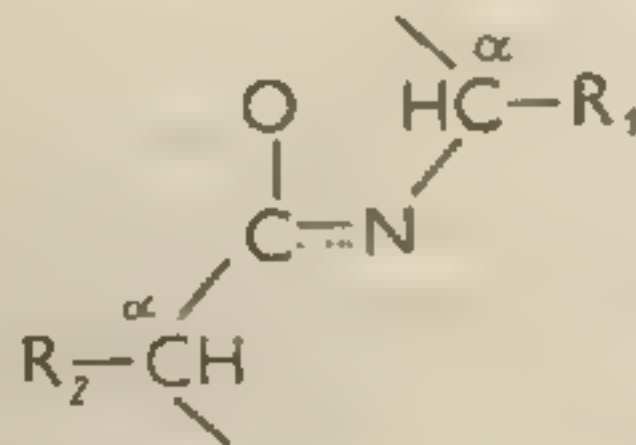
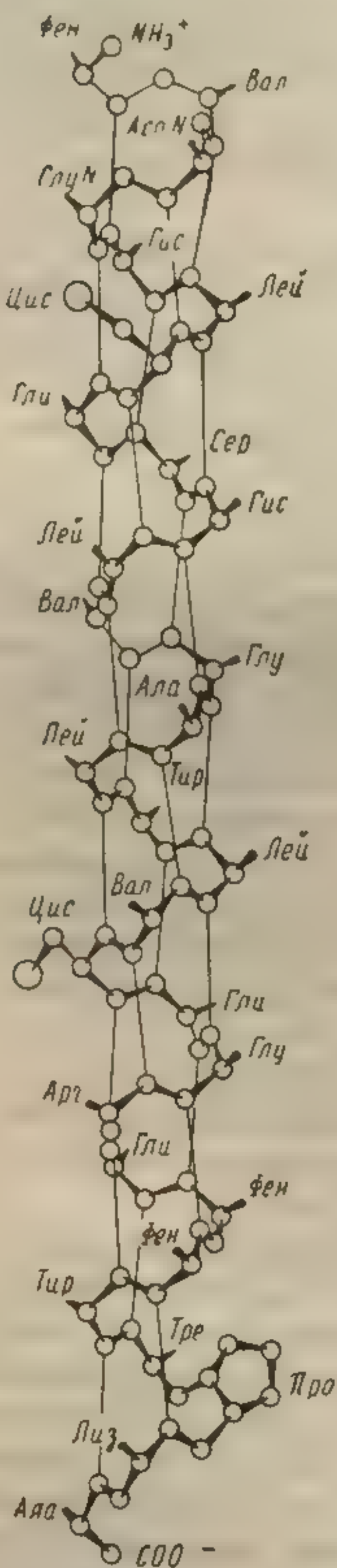
Намного важнее для ферментативной функции последовательность расположения аминокислот в пептидной цепи. Одним из важнейших достижений современной химии белков стало освоение методов, в значительной степени автоматизированных, позволяющих определять последовательность чередования аминокислот. Ее считают необходимой для понимания строения и функции каталитического центра ферментов. Оказалось, что для этой функции необходимы только — определенное число и род аминокислот; нет необходимости в том, чтобы они находились в одной и той же пептидной цепи, или рядом (17). Необходимо отметить, что уже издавна экспериментальные данные указывали на то, что только определенная часть молекулы фермента принимает участие в собственно каталитической функции.

Строение белка. Характерной чертой химического строения белка является наличие пептидной цепи, состоящей из L-аминокислот, соединенных пептидной связью $-\text{CO}-\text{NH}-$. Эта связь образуется из карбоксильной и аминной групп, принадлежащих двум соседним аминокислотам цепи:



Аминокислоты, входящие в состав белок, представлены в таблице 2. Связь между N и C имеет частично характер двойной связи, благодаря чему она является планарной (1,2) т.е. фиксированной в определенной плоскости.

Имея trans форму, она позволяет пептидной цепи свертываться в спираль.



Пептидные цепи в белках состоят не менее, чем из нескольких десятков аминокислот. Их число иногда доходит до нескольких сот. Молекула белка может при этом содержать одну или несколько пептидных цепей.

Число и последовательность чередования остатков отдельных аминокислот определяют т.н. первичную структуру белка (21).

Так как сама пептидная связь неподвижна, то альфа-углерод каждой аминокислоты может свободно вращаться вокруг своей валентности. Эти части пептидной цепи являются гибкими и могут образовывать складки. В водном растворе белки часто принимают форму хаотически сложенных витков. В естественном или, как говорят, нативном состоянии белки представляют собой более или менее регулярные пространственные системы пептидных цепей. Складчатые структуры пептидных цепей укреплены многочисленными слабыми химическими связями. Это т.н. водородные связи, которые внутримолекулярно связывают между собой карбонильные $>O$ и аминовые $>NH$ группы, особенно там



где эти группы находятся достаточно близко друг от друга (около 4,5 Å). Пространственная структура пептидной цепи называется вторичной структурой белка (21).

Одной из типичных вторичных структур белков является α -спираль, витки которой фиксированы водородными связями между группами CO и NH (рис. 1).

Пептидные цепи иногда принимают максимально растянутую форму. Они могут укладываться параллельно и соединяться водородными связями между соседними цепями.

Рис. 1. Альфа-спиральное строение цепи В инсулина (Linderstrom-Lang и Schellman, 1959).

Тогда образуются слоистые или ковровые структуры (рис. 2) из параллельных или пересекающихся пептидных цепей (18). Такого рода образования встречаются в нерастворимых фибриллярных белках или в белковых осадках. Также одномолекулярные слои белка, растянутого силами поверхностного напряжения, характеризуются ковровым строением.

Альфа-спираль Pauling и Corey (19, 20) содержит 3,6 аминокислотных остатков на один виток (18 аминокислот на 5 витков), а шаг витка (осевой сдвиг на один виток или оборот на 360°) равняется 5,4 Å. Спираль вращается вправо

Таблица 2

Аминокислоты, входящие в состав белков

Название	Символ	Характер химических группировок боковой цепи	Строение боковой цепи
Глицин Аланин	гли ала	гидрофобный	$\begin{array}{l} -\text{H} \\ -\text{CH}_3 \end{array}$
Валин	вал		$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH} \end{array}$
Изолейцин	илей		$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Лейцин	лей		$\begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Метионин	мет		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$
1/2-цистин	цис		$-\text{CH}_2-\text{S}-$
Фенилаланин	фен		$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$
Пролин	про	гидрофобный	$\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \\ -\text{CH}_2 \end{array}$
Триптофан	три		$\begin{array}{c} \text{CH} \\ \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{C}-\text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{HC} \quad \text{C} \quad \text{CH} \\ \quad \\ \text{NH} \quad \text{C} \\ \\ \text{H} \end{array}$
Серин	сер	гидрофильные, неионизирующие	$-\text{CH}_2-\text{OH}$
Треонин	тре		$\begin{array}{l} -\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Аспарагин	асп- NH_2		$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
Глутамин	глу- NH_2		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
Гидроксипролин	гипро	гидрофильные, ионизирующие	$\begin{array}{l} \text{CH}_2 \\ \\ -\text{CH}-\text{OH} \end{array}$
Аспарагиновая кислота	асп		$-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Глутаминовая кислота	глу		$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
Цистеин	цис-Н		$-\text{CH}_2-\text{SH}$
Лизин	лиз		$-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}_2$
Аргинин	арг		$-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2$
Тирозин	тир		$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH} \\ \quad \\ -\text{CH}_2-\text{CH} \quad \text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}=\text{CH} \end{array}$
Гистидин	гис		$\begin{array}{c} \text{CH}=\text{CH} \\ \quad \\ -\text{CH}_2-\text{C}-\text{N} \\ \quad \\ \text{CH} \quad \text{CH} \\ \\ \text{NH} \end{array}$

и встречается главным образом в растворимых глобулярных белках. В некоторых условиях она может выпрямляться вследствие разрыва водородных связей (например в концентрированном растворе мочевины, конкурентном по отношению к этой связи). Пептидная цепь при этом принимает форму хаотического свертка, вторичная структура молекулы разрушается.

У многих белков большая часть пептидной цепи принимает форму альфа-спирали и образует структуру, напоминающую жесткий, но не сплошной цилиндр. Размеры и форма белковых молекул указывают на то, что они состоят из ряда отрезков пептидной цепи, свернутых в тесную спираль, перемежку с менее тесно свернутыми отрезками, вследствие чего образуются складки и изменяется направление самой спирали. Это складки высшего

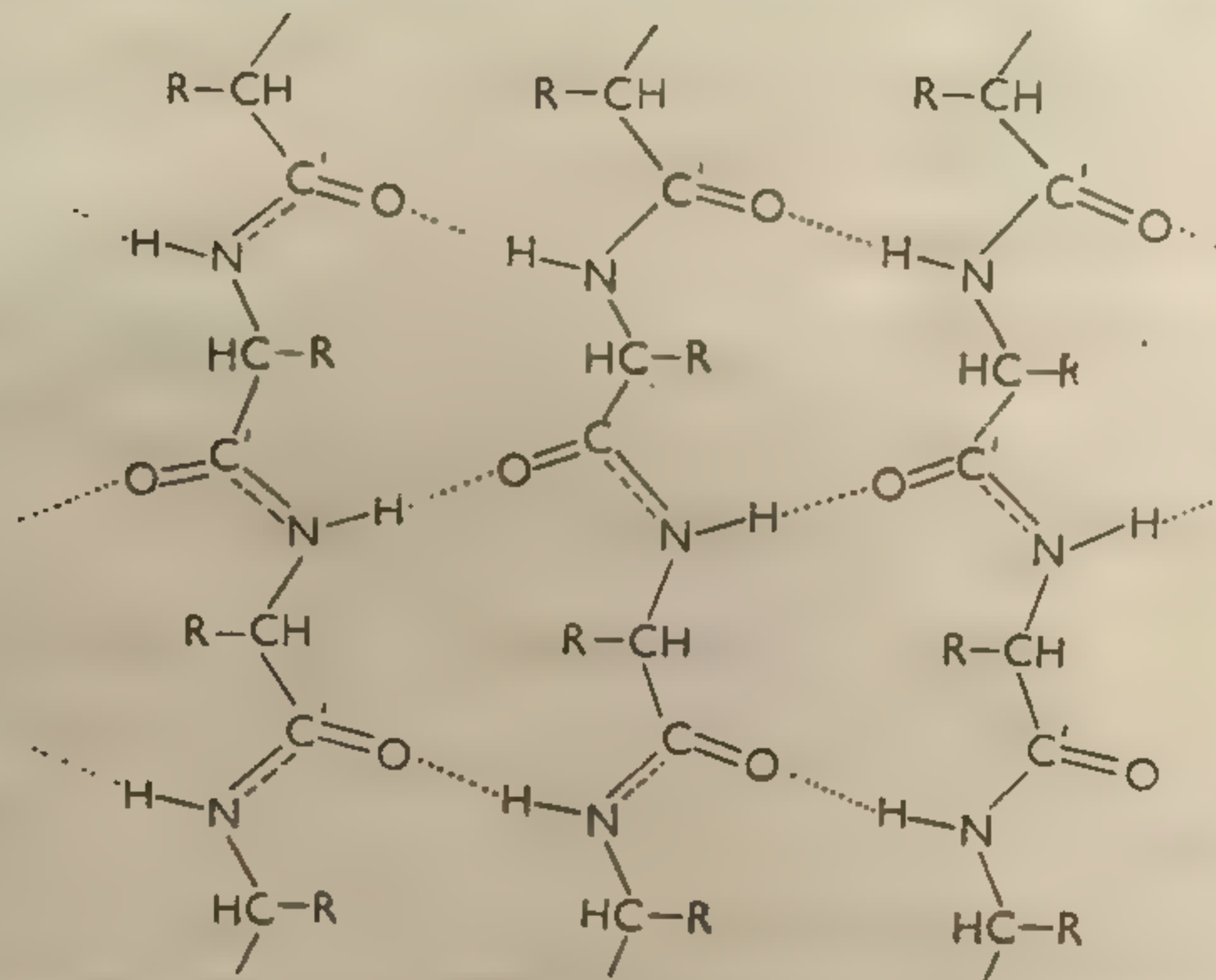


Рис. 2. Ковровое строение белка с параллельными цепями (Pauling L. и Corey R. B., 1951).

порядка. Если в молекуле имеется больше одной пептидной цепи, то эти цепи находятся в определенном взаимоположении зафиксированном слабыми связями. Такие образования из складчатых и спиралеобразных пептидных цепей составляют третичную структуру (21).

Закрепление третичной структуры обусловлено взаимодействием боковых цепей, проходящих перпендикулярно к оси пептидной цепи. В результате между ними возникает ряд связей, иногда очень стойких.

Самыми важными связями, фиксирующими третичную структуру являются дисульфидные мостики —S—S— между остатками цистеина, т.е. связи ковалентного типа. Их разрыв, например путем восстановления в группы —SH— или окисления в группы SO_3H , разрушает стойкость третичной структуры. Дисульфидные мостики находятся преимущественно между соседними пептидными цепями, но они встречаются также и внутримолекулярно, между цистеиновыми остатками одной и той же пептидной цепи. Например, у рибонуклеазы, молекулу которой образует только одна пептидная цепь, состоящая из 124 аминокислот, имеются 4 дисульфидных мостика, превращающие и так уже свернутые цепи в две большие петли (см. стр. 82).

Иногда встречается второй тип ковалентной связи — амидная связь между лизином и дикарбоновыми аминокислотами.

Другой связью, соединяющей пептидные цепи друг с другом, является координационная связь с ионами металлов. Например, алкогольдегид-

рогеназа из дрожжей содержит 4 атома цинка, алкогольдегидрогеназа из печени — 2.

Следующим типом связи, способствующим сохранению третичной структуры, является ионная связь. Она обусловлена электростатическим притяжением химических групп в боковых цепях, носителей зарядов противоположного знака, например, $-\text{COO}^-$ и $-\text{NH}_3^+$. Ионная связь характеризуется значительным радиусом действия и, при наличии многочисленных, хаотически рассеянных зарядов в молекуле белка, может стабилизировать систему пептидных цепей. Парафиновые боковые цепи связаны друг с другом силами ван дер Ваальса, посредством гидрофобных или аполярных связей. Такие связи встречаются у аланина, лейцина, изолейцина, валина и фенилаланина, как внутри одной и той же цепи, так и между соседними пептидными цепями.

Согласно современным взглядам, первичная структура белка имеет решающее значение для образования вторичной и третичной структуры. Иначе говоря, очередность и род аминокислот в пептидной цепи определяет способ ее скручивания и третичной складчатости, в силу действия химических связей, вытекающих из данной очередности аминокислот. Конечно, изменения условий, а именно рода растворителя, pH, рода ионов в растворе и их концентрации должны влиять на эти связи, а тем самым и на внутреннюю структуру белковой молекулы. Следовательно, существует большая пластичность вторичной и третичной структур при абсолютной стойкости первичной. Эти факты имеют огромное значение для выяснения биологических свойств белков, и в первую очередь их каталитической активности.

Часть геометрической структуры белковой молекулы, которую можно изменить, не разрушая ковалентных связей, получила название конформации (22). Физические исследования глобулярных белков показали, что стойкие конформации, по крайней мере частично, являются жесткими. Целый ряд более или менее слабых связей способствует сохранению стойкой конформации при конкуренции с молекулами воды, стремящимися ее нарушить. Однако, имеется возможность конформационной изомерии и взаимного перехода изомерных конформаций друг в друга, в зависимости от перемен температуры, pH и растворителя.

Изменения конформации встречаются при связывании субстрата с активным центром фермента. Внутреннее строение белка является не жестким — его скорее можно назвать пластичным. Некоторые области внутренней структуры молекулы белка отличаются большой конфигурационной свободой, причем процесс перехода из одной конфигурации в другую протекает с незначительными изменениями свободной энергии. Например, связывание кофермента НАД фосфоглицеральдегидрогеназой сопровождается изменением оптической активности. Также повышенная чувствительность апофермента, лишённого НАД, к действию протеолитических ферментов свидетельствует об изменении конформации.

Изменения конформации молекулы белка имеют существенное значение для ориентации химических групп, образующих каталитический центр. Koshland (23) пытается при помощи этой теории объяснить специфичность каталитического центра (теория побуждаемой приспособляемости).

Из-за недостатка места, в этой главе затронуты только некоторые общие аспекты строения белковых молекул. Более подробные сведения читатель найдет в монографии „The Proteins“ (24) а также в главе Linderstrom — Lang и Schellman (25) во втором издании „The Enzymes“, под редакцией Boyer, Lardy и Myrbäck.

ПРОСТЕТИЧЕСКИЕ ГРУППЫ ФЕРМЕНТОВ

Лишь небольшое количество ферментов принадлежит к простым белкам, т.е. состоит исключительно из аминокислот. К их числу принадлежат рибонуклеаза, амилаза и альдолаза. Большинство ферментов представляет собой сложные белки, т.е. содержит неаминокислотные химические группы, более или менее прочно связанные с пептидной цепью. К этим чужеродным группам принадлежат: остаток фосфорной кислоты, группы сахаров, флавины, соединения гема, нуклеотиды или группа каротена. Эти группы называются простетическими. Часто простетическими группами являются производные витаминов.

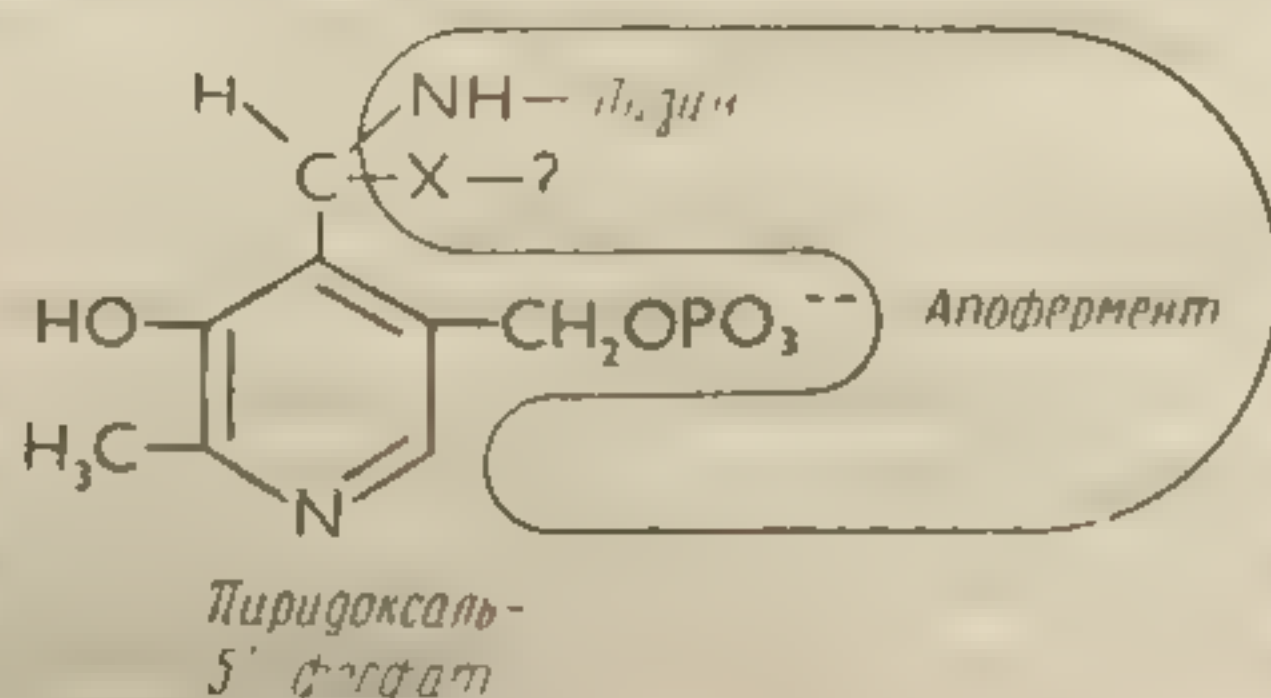


Рис. 3. Простетическая группа фосфорилазы а из мышцы (Brown и Cori, 1961).

Связи соединяющие простетические группы с белками, бывают разного характера. Преимущественно это ковалентные связи. Так связана фосфорная кислота с серином в трипсине, химотрипсине и фосфогликомутазе. Ковалентная пептидная связь соединяет ϵ -аминовую группу лизина, входящего в состав апофермента, и карбоксильную группу липоиновой кислоты в пируватоксидаза. В фосфорилазе а из мышц простетическая группа фосфат, пиридоксала (фосфорнокислый эфир витамина B_6) связана двойной ковалентной связью с каждой из 4 белковых подъединиц. Одна связь соединяет формильную группу в положении 4 с апофосфорилазой, вторая — ту же группу с ϵ -аминовой группой лизина в апоферменте.

Простетическая группа, открытая Baranowski и сотр. (26) оказалась одновременно активной группой фермента (26a).

Координационные связи также принимают участие в связывании простетической группы, преимущественно посредством двухвалентного металла, такого как магний, марганец, цинк. В алкогольдегидрогеназе печени эту роль выполняет цинк с координационным числом 6. Его участие в присоединении простетической группы НАД видно на рис. 4 (27). Цинк связывает НАД двумя координационными валентностями, апофермент — другими тремя, шестая же связывает субстрат (алкоголь).

Во многих ферментах координационно связанный металл сам составляет иж простетическую группу (металлоферменты), необходимую для каталитической функции. Кроме того, предполагают, что ионы двухвалентных металлов (Ca, Zn, Co) стабилизируют конформацию молекулы белка. По-видимому металлы играют эту роль во всех ферментах.

Более слабые связи, типа сил ван дер Ваальса, а также водородные и ионные связи принимают участие в присоединении простетической группы к апоферменту. Примером может быть связывание флавинового кофермента в старом желтом дыхательном фермента Варбурга (см. стр. 000), который соединяется с апоферментом двумя связями ионного типа и двумя водородными связями. Эта группа относительно легко диссоциирует, например при диализе в кислой среде. Эта диссоциация обратима, и каталитическая функция восстанавливает-

ся. У сукцинатоксидазы, которая также является флавопротеидом, простетическая группа связана сильнее, а именно ковалентной связью между белком и изоаллоксазиновым ядром кофермента.

Определение химических групп в молекуле фермента представляет важную задачу. Как правило, простетическая группа связана с каталитической активностью. Там, где удалось это доказать, говорят о простетической группе, как о коферменте и считают, что она составляет часть каталитического центра фермента.

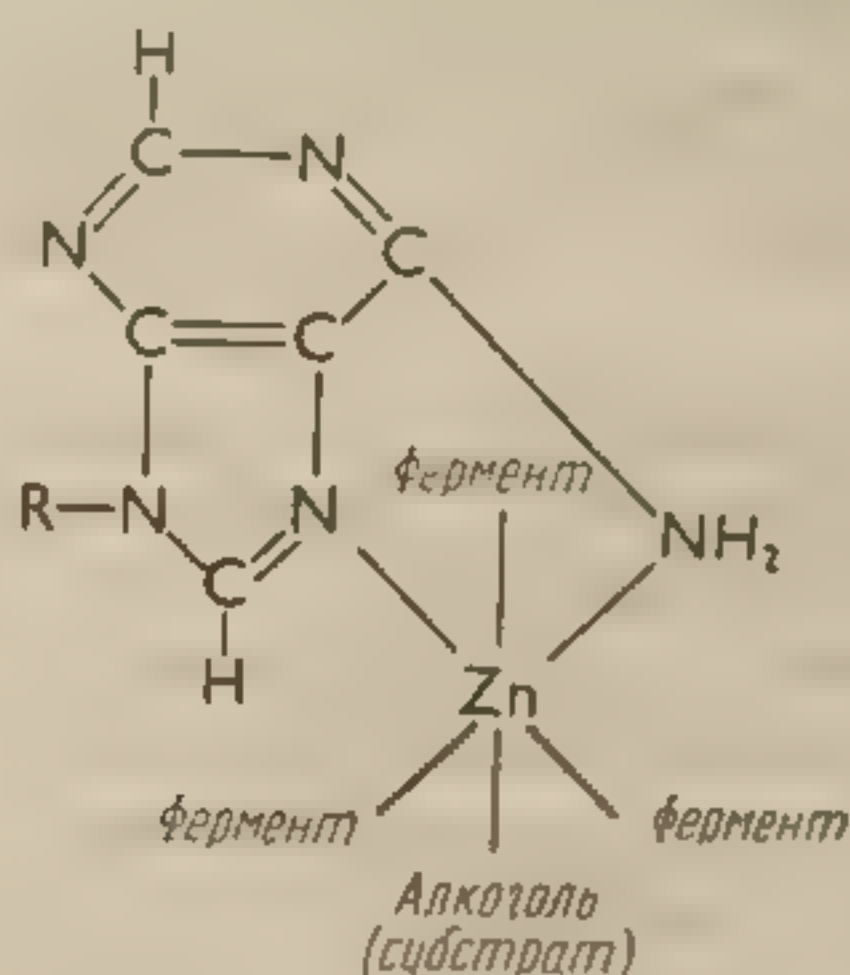


Рис. 4. Простетическая группа алкоголь-дегидрогеназы из печени (Theorell, 1961).

тического центра фермента. Мы часто знаем характер простетической группы, но не располагаем доказательствами ее участия в ферментативной деятельности. Бывает и наоборот — имеется простетическая группа, составляющая часть каталитического центра, которая будучи низкомолекулярным органическим соединением или металлом, неуловима при обычных методах анализа. В таких случаях требуются особо чувствительные методы, например спектральные. Сказанное относится главным образом к определению металлов в ферментах.

Число простетических групп обычно совпадает с числом мест, связывающих субстрат с ферментом. Примером является связывание НАД печеночной алкогольдегидрогеназой (28), которое сопровождается изменением в ультрафиолетовом спектре. На этом основании было установлено, что апофермент связывает две молекулы кофермента, следовательно он обладает двумя простетическими группами.

Связывание субстрата можно также определять равновесным диализом (29) или центрифугированием апофермента, уравновешенного в растворе с коферментом, и измерением его концентрации в слое центрифугата, содержащего фермент (30). Таким путем было обнаружено связывание 4 молекул НАД алкогольдегидрогеназой из дрожжей.

Определение числа простетических групп осуществляется также при помощи реактивов специфических для этих групп. Например тиольные группы глутатиона или кофермента А реагируют с п-хлормеркурибензоатом, йодуксусной кислотой и другими реактивами для SH групп. Исследования торможения некоторых эстераз и пептидаз диизопропилфторфосфатом могут показать количество активных центров в ферменте на основании числа присоединенных атомов водорода.

Более подробные данные о строении, способе связывания и деятельности простетических групп читатель найдет в главе о коферментах (стр. 16), являющихся естественными активаторами ферментов.

КОФЕРМЕНТЫ

Активными группами многих ферментов являются коферменты. Это органические соединения, преимущественно производные фосфорной кислоты, нестойко связанные с белком или образующие ковалентно присоединенную простетическую группу. Функцией кофермента является участие в катализируемой реакции, причем в процессах, протекающих *in vivo* количество фермента и его химическое строение остаются на вид неизменными. В действительности, как наблюдается при реакциях, катализируемых изолированными, одиночными ферментами, кофермент является одним из субстратов ферментативной реакции. При второй сопряженной реакции изменения в коферменте протекают в обратном направлении и он воспроизводится в первоначальной форме.

Обобщая можно охарактеризовать роль коферментов как переносчиков определенных атомов, электронов или химических групп с соответствующего донора на соответствующий акцептор. Строение апофермента определяет специфичность этой реакции, а строение кофермента — ее тип.

Переносимыми группами могут быть глюкозильные, ацетилные, метильные и другие группы. Может также происходить внутримолекулярный перенос протонов или групп OH (эпимеризация). В таблице 3 представлена классификация коферментов по отношению к переносимым химическим группам.

Пиридиновые коферменты (31, 32). Пиридиновые коферменты являются составной частью пиридиновых ферментов и их активной группой. Они встречаются главным образом в клеточной цитоплазме (90%) и, в значительно меньшем количестве, в митохондриях (10%). Пиридиновые коферменты активируют не меньше 80 ферментов типа дегидрогеназ, функция которых состоит в переносе 2 атомов водорода. В связи с этим они встречаются в двух формах — окисленной и восстановленной.

Было исследовано химическое строение никотинамидадениндинуклеотида, обозначенного сокращением НАД (прежние названия ДПН⁺, козимаза, кодегидраза I, кофермент I) и никотинамидадениндинуклеотида фосфата, или НАДФ (прежние названия ТПН⁺, фосфокозимаза, кодегидраза II, кофермент II). Это названия окисленных форм коферментов. Восстановленные формы обозначают НАД · H₂ (прежде ДПН · H) и соответственно НАДФ · H₂ (прежде ТПН · H).

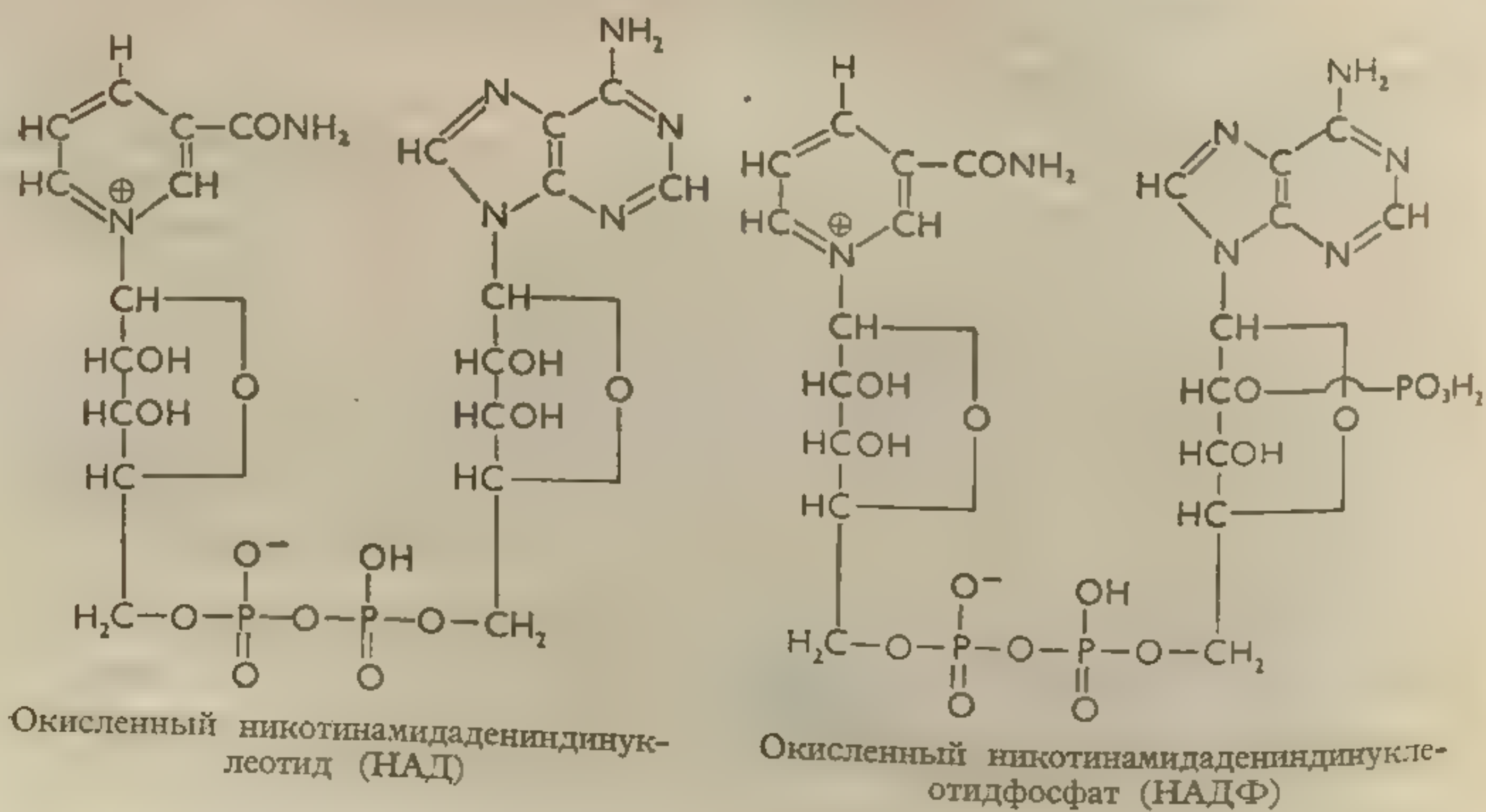


Таблица 3

Название кофермента	Сокращение	Переносимая группа	Витамин, соответствующий коферменту
I. Коферменты оксидоредуктаз			
Никотинамидадениндинуклеотид	НАД	2H	Ниацинамид
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат	НАДФ	2H	Ниацинамид
Никотинамидмононуклеотид	НМН	2H	Ниацинамид
Флавиномононуклеотид	ФМН	2H	Рибофлавин
Флавинадениндинуклеотид	ФАД	2H	Рибофлавин
Цитохромы		e ⁻	—
Пиридоксальфосфат	ПАЛ	2H	Пиридоксаль
II. Коферменты изомераз			
Пиридоксальфосфат	ПАЛ	рацемизация	Пиридоксаль
Никотинамидадениндинуклеотид	НАД	эпимеризация	Ниацинамид
Восстановленный глутатион		изомеризация	—
III. Коферменты лиаз			
Пиридоксальфосфат	ПАЛ	декарбоксиляция	Пиридоксаль
Тиаминпирофосфат		декарбоксиляция	Тиамин
Кофермент B ₁₂		перемещение карбоксильной группы	Витамин B ₁₂
IV. Коферменты трансфераз			
Кофермент A	КоА	ацильная группа	Пантотеновая к-та
Тетрагидрофолиевая кислота	КоФ	формильная группа	Птероилглутаминовая кислота
Аденозилметионин		метильная группа	(метионин)
Биотин		CO ₂	Биотин
Тиаминпирофосфат		C ₂ -альдегидная группа	Тиамин
Пиридоксальфосфат	ПАЛ	аминогруппа	Пиридоксаль
Пиридоксальфосфат	ПАЛ	глюкозильная группа	Пиридоксаль
Фосфоаденилсульфат		сульфатная группа	—
Аденозинтрифосфат	АТФ	фосфатная группа, аденилильная группа (АМФ)	—
Уридиндифосфат	УДФ	глюкозильные и уридинильные группы	—
Цитидиндифосфат	ЦДФ	фосфорилхолиновая группа	—
V. Коферменты лигаз			
Пиридоксальфосфат	ПАЛ	присоединяет разные группы	Пиридоксаль

Формулы окисленных форм пиридиновых коферментов приведены выше. Это динуклеотиды, состоящие из аденилового и пиридинового нуклеотидов (основой которого является никотинамид), соединенных пирофосфатной связью. У НАДФ добавочный остаток фосфорной кислоты находится на C₂ рибозы, принадлежащей адениннуклеотиду.

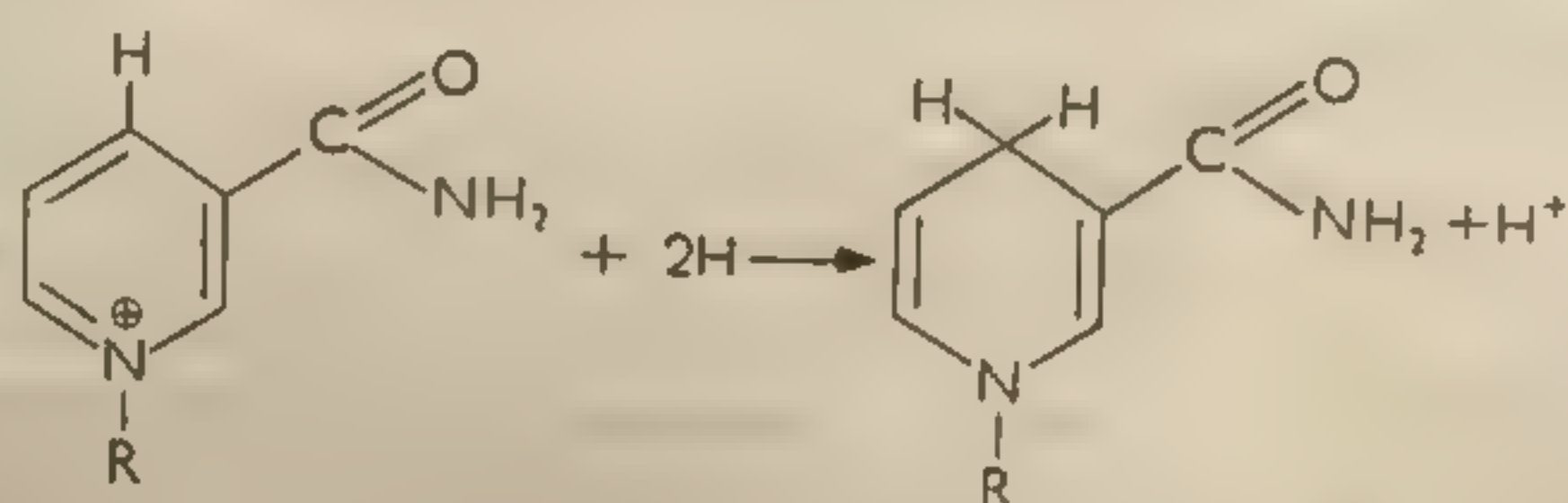
При восстановлении пиридиновое ядро коферментов присоединяет 2 атома водорода. Одновременно четвертичный азот пиридина принимает трехвалентную структуру и освобождает граммэквивалент протона (водородного иона).

Восстановление пиридинового ядра НАД и НАДФ при ферментативных реакциях сопровождается изменением абсорбционного спектра в диапазоне

340 мμ. Окисленные НАД и НАДФ отличаются типичной для пуринового ядра абсорбционной полосой при 260 мμ. После восстановления появляется новый максимум абсорбции при 340 мμ. Молярный коэффициент оптической плотности при этой длине волны относительно велик ($\epsilon = 6,22$), так, что при помощи спектрофотометра можно точно определять очень малые количества восстановленных пиридиннуклеотидов.

Окислительно-восстановительный потенциал системы НАД/НАД · H₂ при pH 7 и темп. 25° равняется 0,320 V, системы НАДФ/НАДФ · H₂ — 0,324 V.

Соединение пиридиновых коферментов с апоферментами вызывает изменения в абсорбционном спектре, в его ультрафиолетовой части а также в ха-

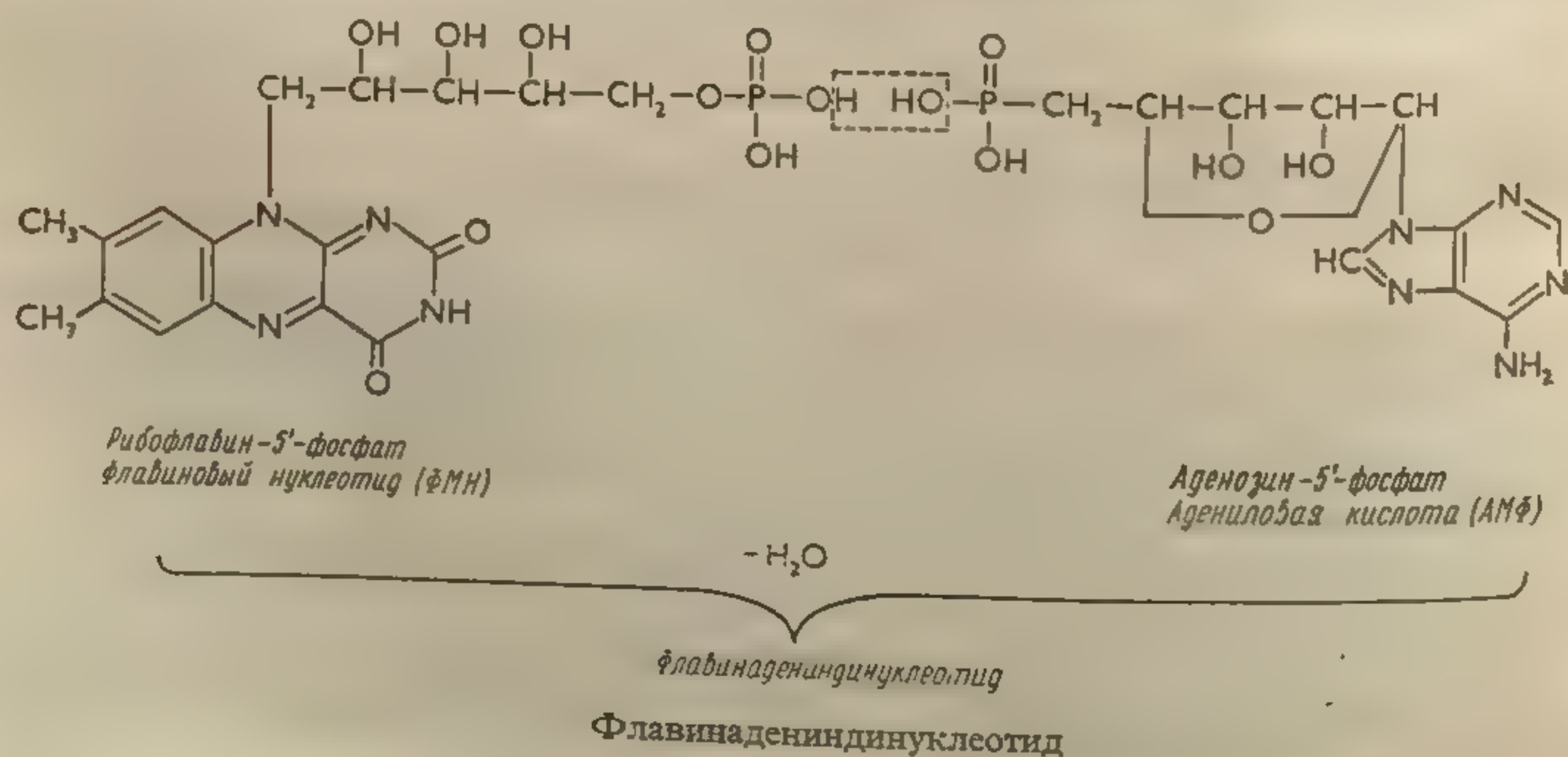


Восстановление пиридинового ядра коферментов

рактерном спектре восстановленных коферментов, который показывает смещение максимума абсорбции. Одновременно увеличивается интенсивность индуцированной флуоресценции, и смещается ее максимум. Благодаря этому можно использовать спектральные методы и при исследовании соединений между коферментом и апоферментом пиридиновых дегидрогеназ.

Флавиновые коферменты. Флавиновые коферменты (33, 34) отличаются желтым цветом. Первым соединением этой группы, полученным в чистом виде, был лактофлавин молочной сыворотки. Warburg и Christian изолировали из дрожжей катализатор дыхания, названный ими желтым дыхательным ферментом, в молекуле которого находился лактофлавин. Ферменты подобной структуры (в настоящее время их известно свыше 50) содержат дериваты лактофлавина в качестве простетической и активной группы. Они называются флавиноферментами или флавопротеидами.

Простетическими группами флавиновых ферментов являются соединения аналогичные нуклеотидам, отсюда название флавиннуклеотидов. Простейший



из них, флавиномононуклеотид (ФМН) состоит из лактофлавина, этерифицированного фосфорной кислотой. Это соединение называется рибофлавином (витамин В₂).

Более сложные простетические группы желтых ферментов имеют форму флавинадениндинуклеотида (ФАД). Кофермент этого типа был найден впервые в почечной оксидазе D-аминокислот.

Флавиновые нуклеотиды легко восстанавливаются, причем 2 атома водорода присоединяются к изоаллоксазиновому ядру. После связывания флавиновых нуклеотидов с апоферментами смещается максимум абсорбции, расположенный при 375 и 450 мμ. Соединение флавиновых нуклеотидов с апоферментом также тормозит характерную для флавинов желтовато-зеленую флуоресценцию. Одной из причин торможения флуоресценции является образование водородной связи между белком и группой NH в 3 положении изоаллоксазина.

Окислительно-восстановительный потенциал флавиномононуклеотида (ФМН) равняется 0,190 V, флавинадениндинуклеотида (ФАД) — 0,123 V в фосфатном буфере при pH 7,0 и темп. 30°C.

Флавиновые ферменты были детально исследованы по методу флуоресценции и на основании техники торможения ферментативной активности структурными аналогами простетической группы. На основании имеющихся наблюдений считают, что в диафореазе НАДФ · Н₂ (старом желтом ферменте Варбурга) имеется следующая связь между апоферментом и коферментом

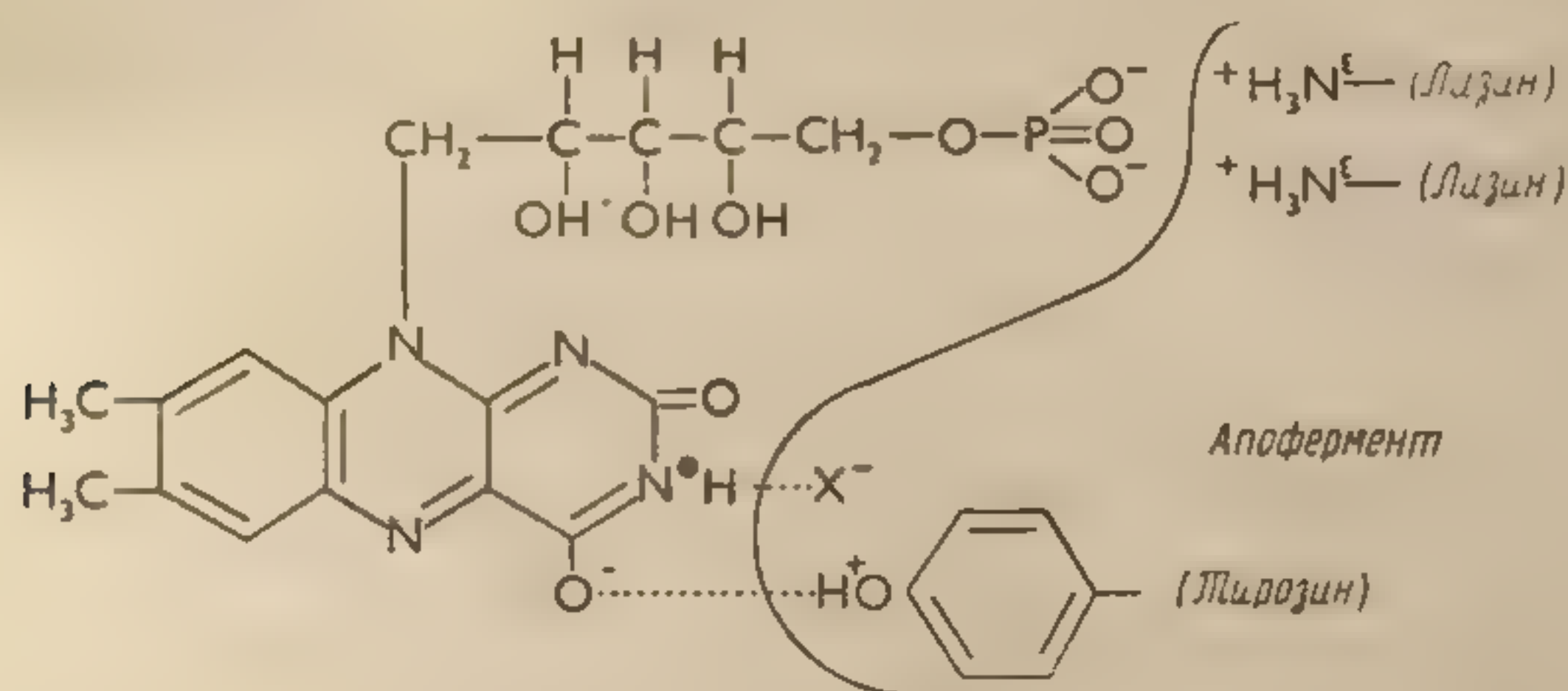


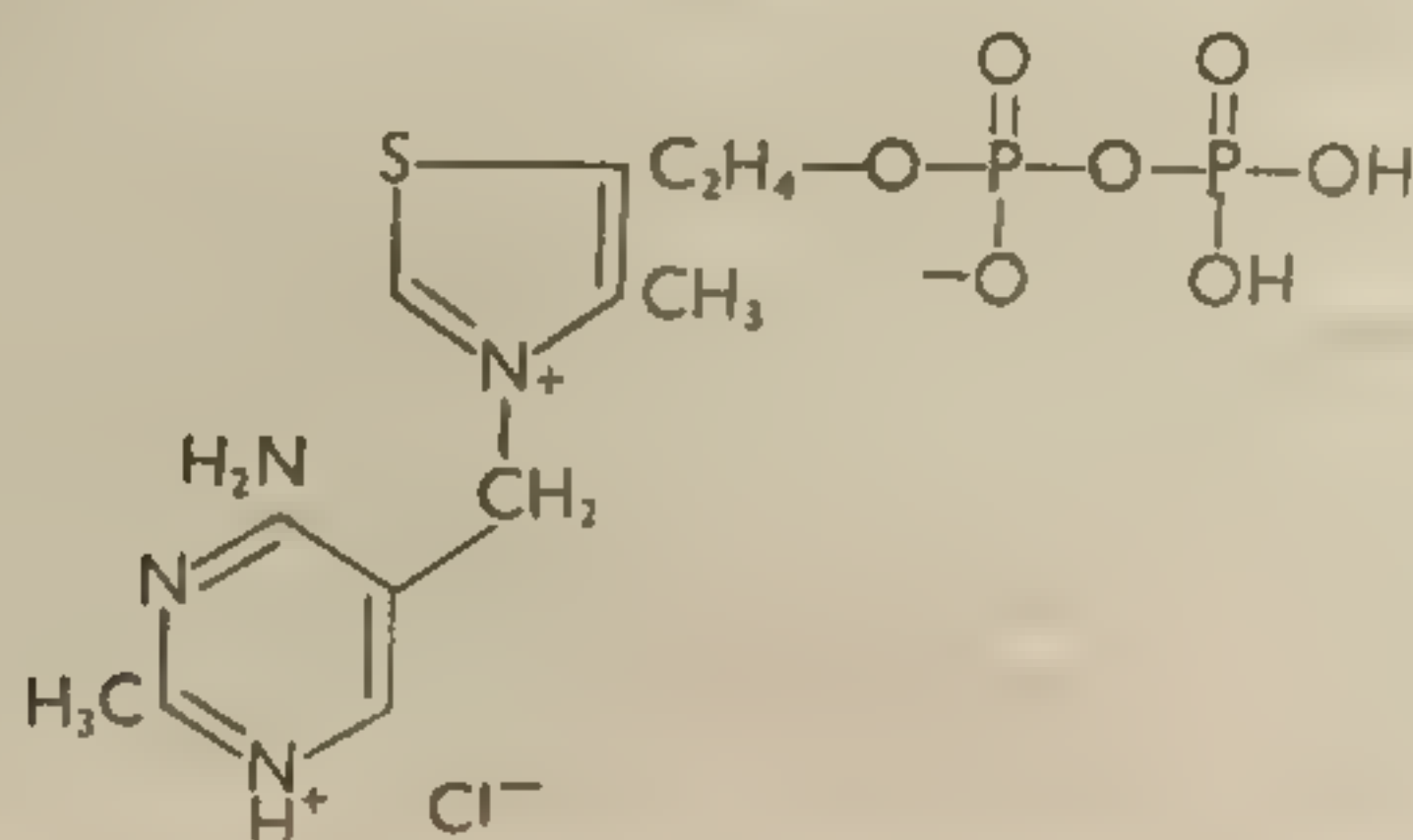
Рис. 5. Строение НАДФ · Н₂-диафореазы („старого“ желтого дыхательного фермента Warburg).

Иной тип связи был обнаружен у другого флавинового фермента — сукцинатоксидазы. Связь между белком и изоаллоксазиновым ядром является настолько стойкой, что ее считают ковалентной.

Тиаминовый кофермент (35, 36). Тиамин был первым витамином, полученным в чистом виде (витамин В₁). Роль витамина как профермента была обнаружена Lohmann и Schuster (37), изолировавшими из дрожжей кокарбоксиллазу, фактор необходимый для декарбоксилирования пировиноградной кислоты. Кокарбоксиллаза оказалась пирофосфорным эфиром тиамин. Тиаминопирофосфорная кислота является примером высоко специфического кофермента, так как даже небольшие изменения в структуре вызывают полную потерю коферментативной функции. Известен лишь один природный кофермент этого типа.

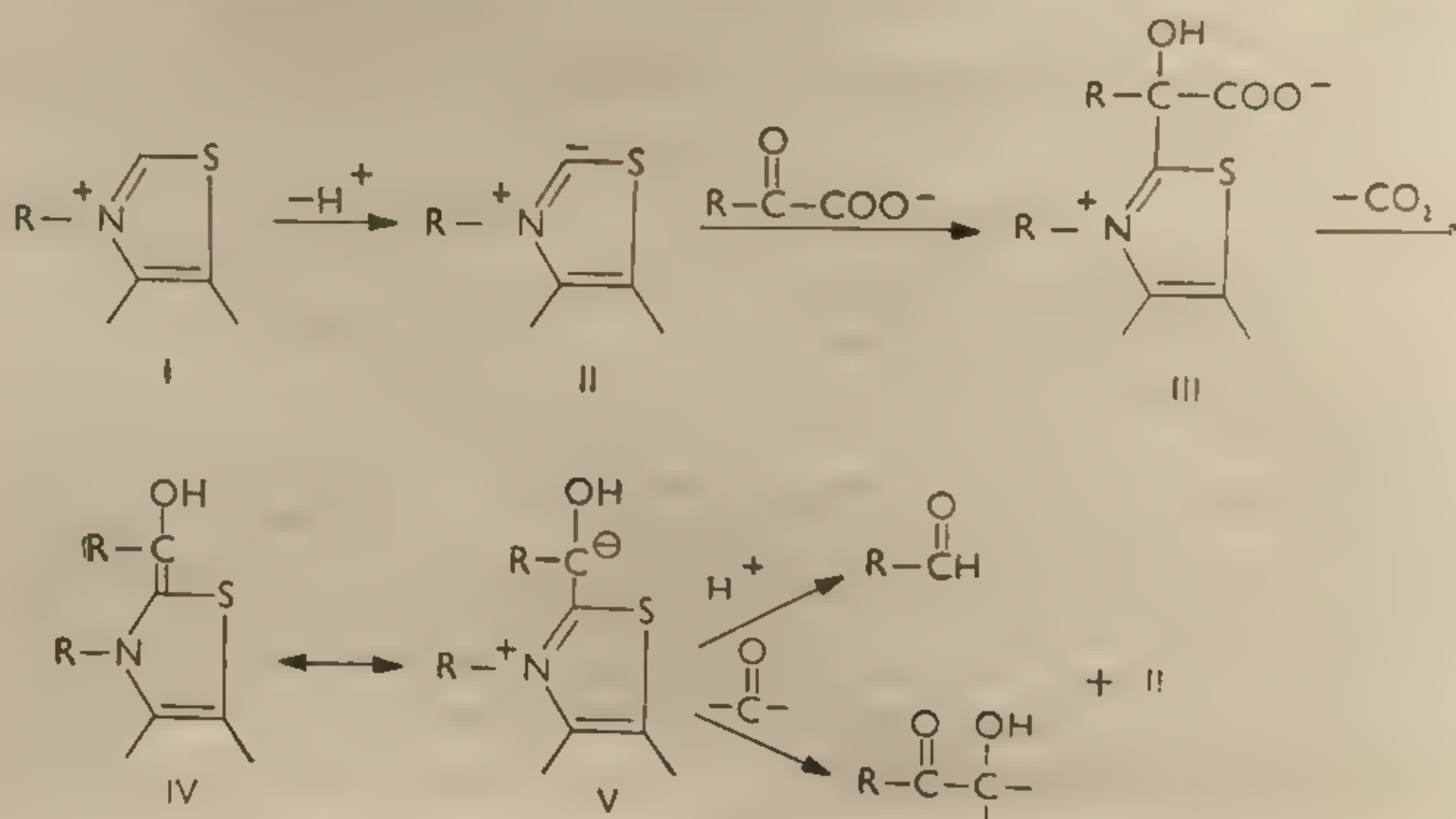
Механизм катализа тиаминовых ферментов (пируватдекарбоксиллаза, транскетолаза) был исследован в модельной реакции (38) между пируватом и тиа-

мином (I). При этом освобождается (рН 8,8) CO_2 и накапливается промежуточное соединение, обладающее качествами „активного ацетальдегида“ (IV). Это соединение было получено синтетическим путем. „Активный ацеталь-

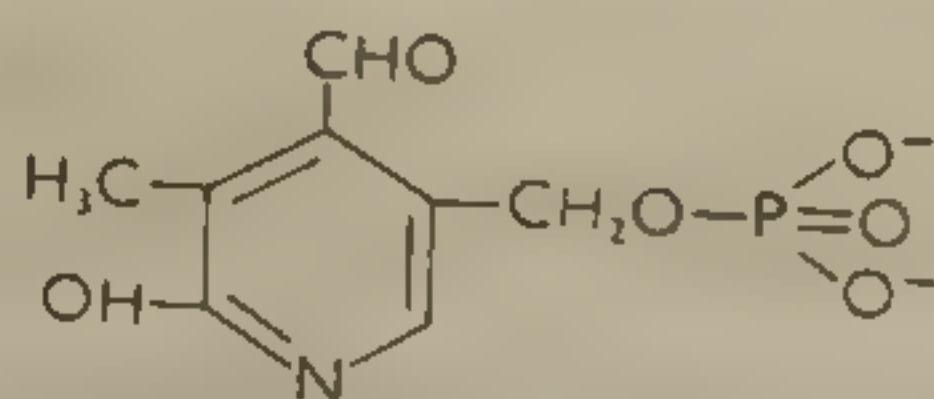


Кокарбоксилаза

дегид“ реагировал как пировиноградная кислота, или вообще кетокислота, но уже без отщепления CO_2 . Ход активации кетокислоты, вероятно происходящий в ферментативных реакциях, изображает следующая схема:

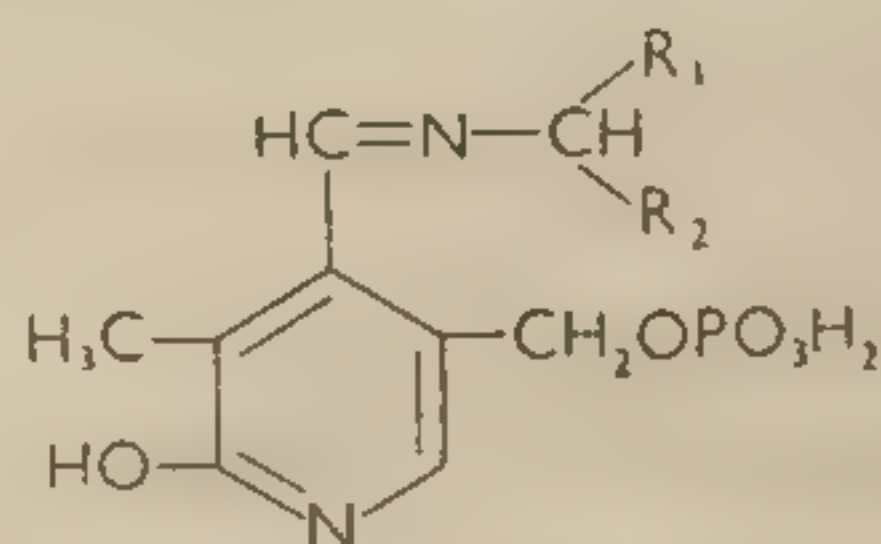


Пиридоксальфосфат. Этот кофермент входит в состав большой и весьма разнообразной по функции группы ферментов (39). В неё находят например аминотрансферазы, декарбоксилазы аминокислот, рацемазы аминокислот, ряд синтетаз, диаминооксидаза, фосфорилаза и другие. Активной группой является всегда пиридоксаль-5-фосфат, очень распространенное соединение, входящее в состав каждой клетки. Пиридоксальфосфат встречается в форме пиридоксальфосфатных протеидов или ферментов.



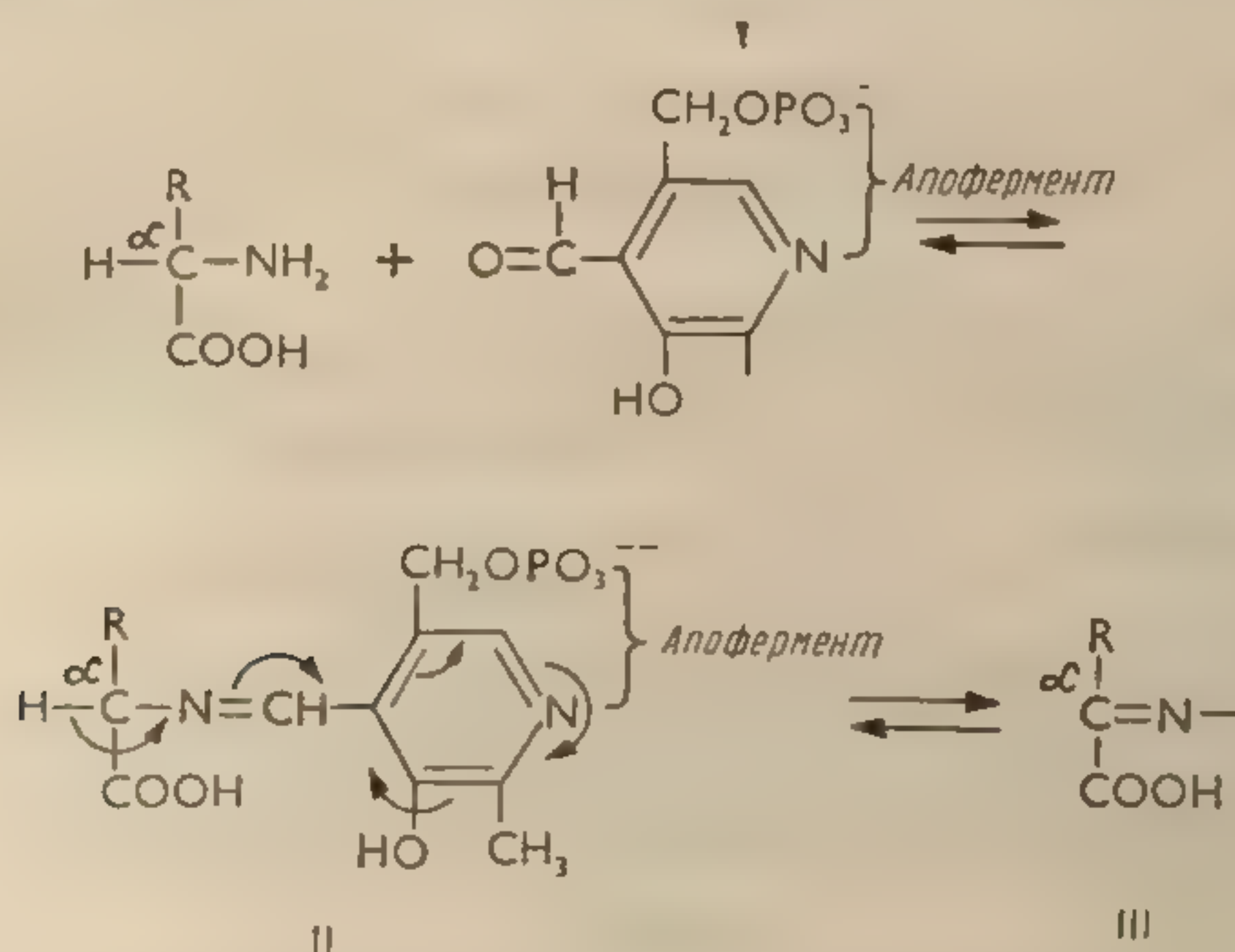
Пиридоксальфосфат

Важной реакцией пиридоксали и пиридоксальфосфата является конденсация с аминогруппами аминокислот и аминов. При этом образуется основание Schiff или соединение азометанового типа:



Основание Schiff

Согласно теории Браунштейна (40) ферментативное превращение аминокислот в кетокислоты, катализируемое пиридоксальфосфатными ферментами (I), состоит в образовании промежуточного соединения азометинового типа — пиридоксалидена (II), который легко переходит в таутомерную форму (III), как видно на схеме:

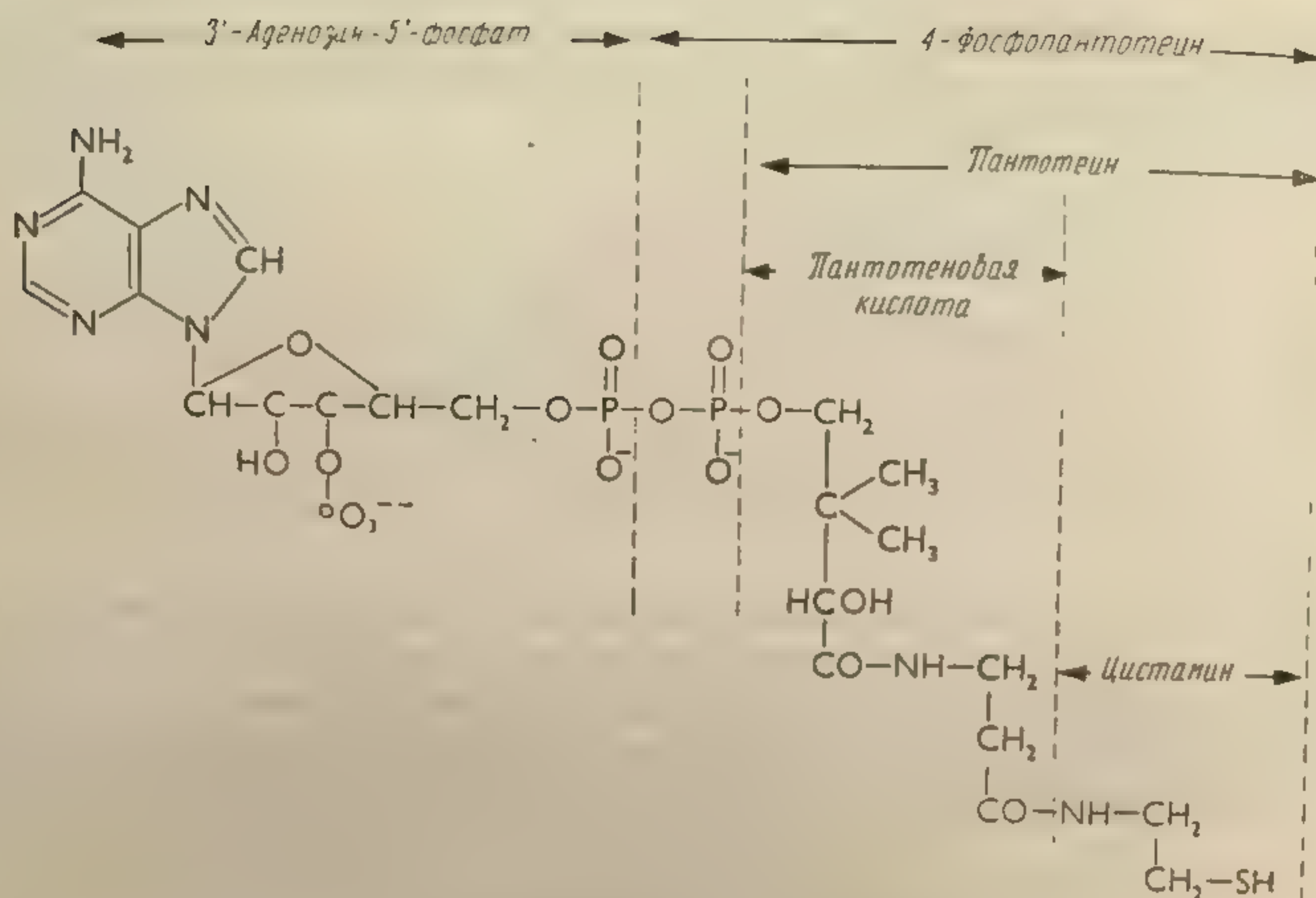


Таким образом активируется химическая связь у альфа-углерода субстрата, что проявляется в реакциях переаминирования и декарбоксилирования аминокислот. Связи у углеродов-бета и гамма могут также активироваться в зависимости от специфичности апофермента.

Кофермент А (41). Кофермент А был открыт во время работ по биологическому ацетилированию. Этим объясняется его название (сокращение КоА). О том, что он биологически необходим свидетельствуют авитаминозы у животных, а также его влияние на рост дрожжей и бактерий. Эти опыты доказали необходимость пантотеновой кислоты, входящей в состав кофермента А. Это дипептид, (+)- α,γ -дигидрокси- β,β -диметил-бутил- β -аланин.

Биологически активная форма пантотеновой кислоты представляет собой весьма сложное соединение. Его структуру изображает следующая формула, в которой обозначены отдельные компоненты соединения.

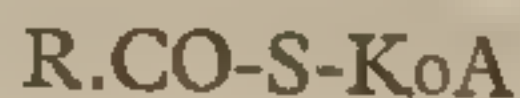
Лупен и сотр. (42) доказали тождественность ацетильной производной КоА с постулированным в промежуточном обмене активным двууглеродным фрагментом, или „активным ацетатом“. Оказалось, что в реакциях биологического



Кофермент А (КоА)

ацетилирования, кроме фермента (трансфераза), принимает участие КоА, являющийся носителем ацетиловой группы. Функция КоА не ограничивается переносом ацетиловой группы, а охватывает широкий диапазон ацильных групп.

Кофермент А обладает свойствами нуклеотида и меркаптана. Его реактивную группу составляет тиольная группа SH. Именно она играет главную роль в биологическом процессе активирования жирных кислот. В присутствии соответствующего фермента образуются ацилмеркаптаны или тиолэфиры из КоА и жирной кислоты. Общая формула ацилмеркаптанов, подчеркивающая участие группы-SH в активации жирной кислоты, имеет следующий вид:

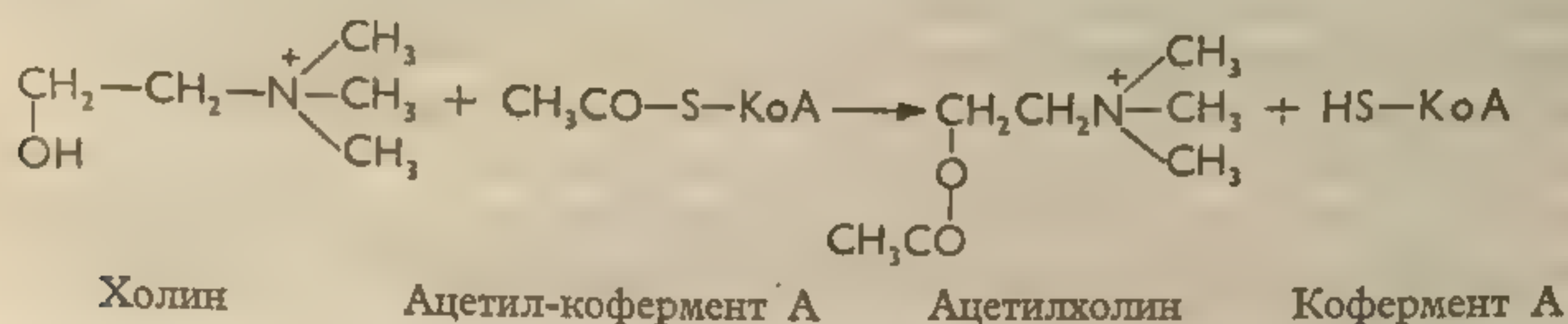


где R.CO-означает ацильную группу любой карбоновой кислоты. Присоединение ацильных остатков посредством тиолэфирной связи к КоА сообщает жирным кислотам химическую реактивность, так как во время гидролиза таких соединений освобождаются большие количества энергии, чем при гидролизе простой эфирной связи, как например у глицеридов. Ацилмеркаптаны можно считать ангидридами карбоновых кислот, аналогичными по структуре высокоэнергетическому ацилфосфату, ангидриду фосфорной кислоты (например ацетилфосфат). Ацетил-S-CoA отличается высоким количеством свободной энергии гидролиза ($-8,25$ ккал/моль при pH 7,0, темп. $25^{\circ}C$ и при молярных концентрациях реагентов), что близко к значениям свободной энергии гидролиза ацетилфосфата или пирофосфатной связи в АТФ. Поэтому при реакциях ацетилирования (например сульфонида в печени) необходимо присутствие высокоэнергетического соединения АТФ в качестве источника энергии, для реакции сочетания жирной кислоты с КоА.

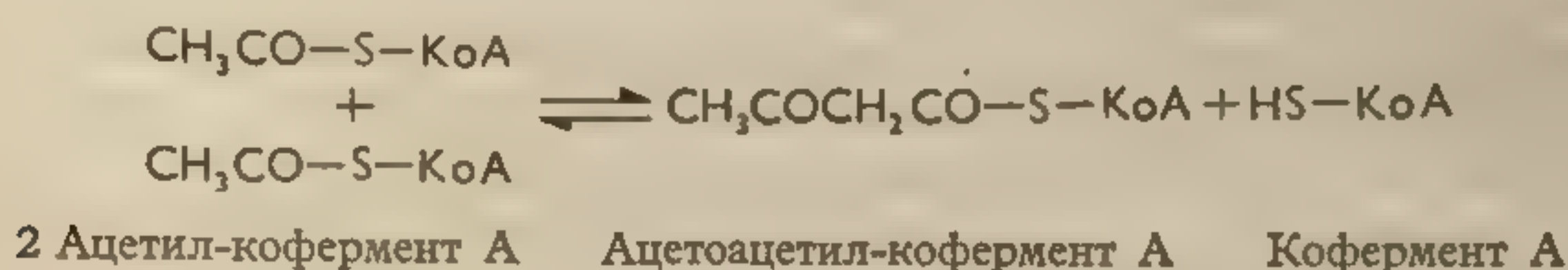
Ацилмеркаптаны кофермента А принимают участие в двух основных типах реакций: а) реакции ацилирования посредством активируемой наличием

кофермента А карбонильной группы; б) реакции конденсации посредством активируемой α -метиловой группы ацил-S-KoA.

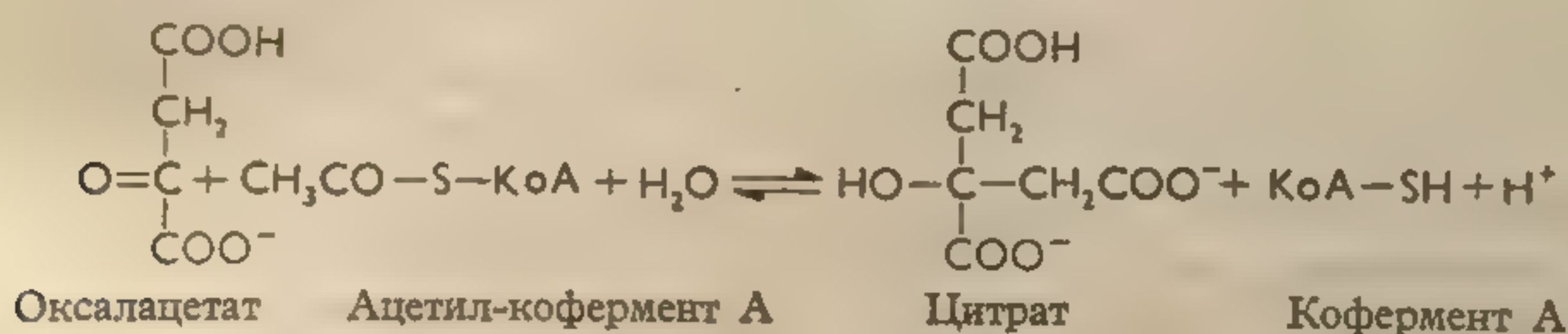
Примером первой реакции является ацилирование сульфонида или холина:



Примером реакции второго типа может служить конденсация 2 молекул ацетил-S-KoA в ацетоацетил-S-KoA, приводящая в биологических превращениях жиров к ацетоуксусной кислоте:

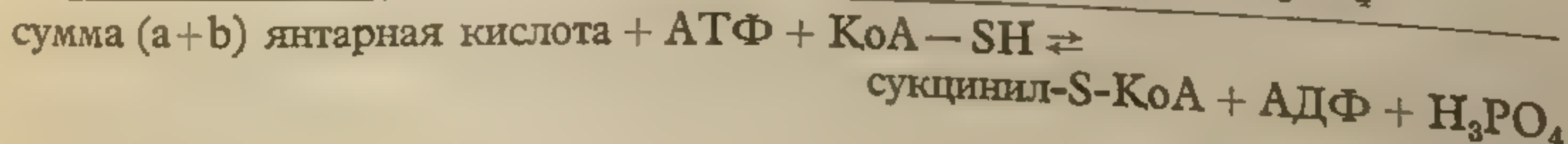
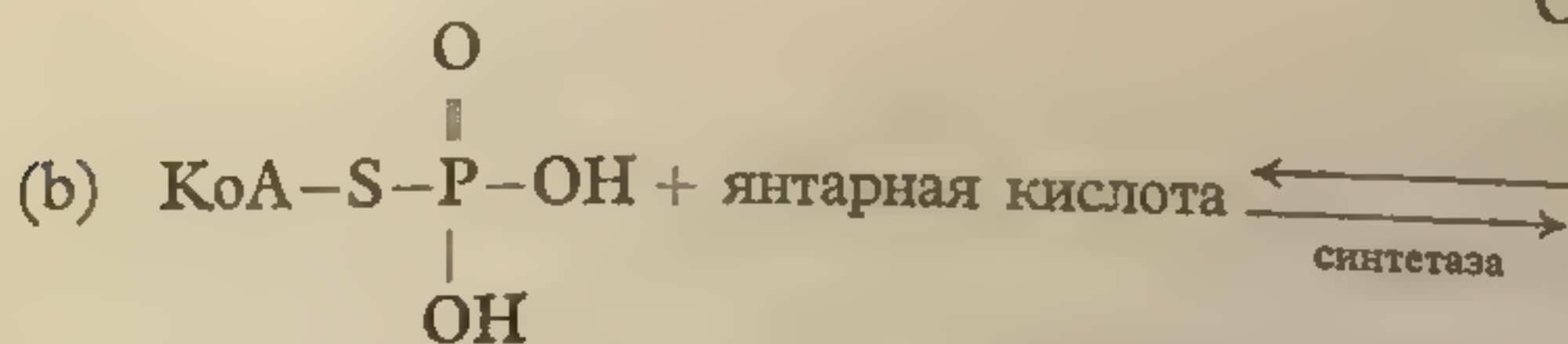
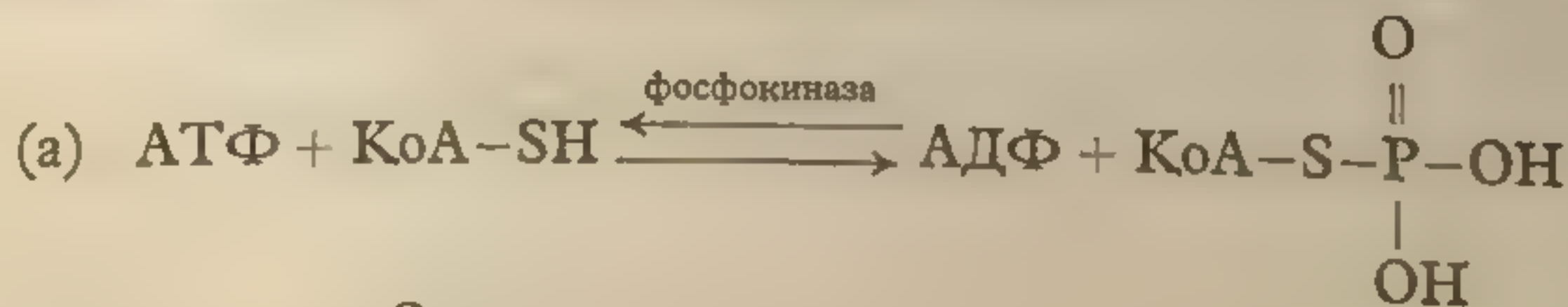


Другим примером является образование лимонной кислоты путем конденсации между ацетил-S-KoA и щавелевоуксусной кислотой:



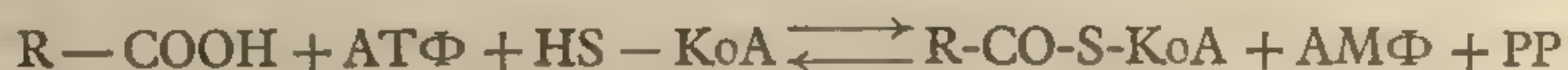
Конечно, в описанных типах реакций переноса активных ациловых групп, кроме ацилпроизводных кофермента А, необходимы специфические ферменты, класса трансфераз, сообщаящие этим реакциям требуемую скорость.

Часто в реакции переноса ацильной группы встречается промежуточное, также высокоэнергетическое соединение. Это фосфорил-S-KoA, существующий только в соединении с ферментом типа фосфокиназы. В этом соединении отдельный фермент типа лигазы (сукцинил-S-KoA — синтетаза) заменяет фосфорильный остаток остатком янтарной кислоты. Ход реакции следующий:



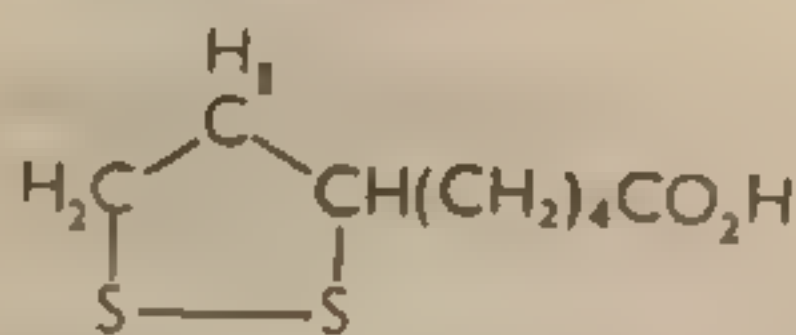
Заслуживает внимания обратная суммарная реакция, при которой за счет сукцинил-S-KoA, высокоэнергетического соединения, из АДФ и неорганического фосфата, возникает АТФ. Аналогичная реакция с ГДФ и фосфатом, связанная с циклом трикарбоновых кислот, образует ГТФ; реакция состоит в фосфорилировании на уровне субстрата, причем используется свободная энергия окисления α -кетоглутаровой кислоты в янтарную кислоту.

Активация жирных кислот путем образования ацил-S-KoA за счет высокоэнергетической АТФ катализируется многочисленной группой ферментов также и в реакциях другого типа. Промежуточным соединением при этом являются аденилаты жирных кислот. Суммарная реакция протекает следующим образом:



В ходе такой реакции образуются например активные жирные кислоты в митохондриях печени.

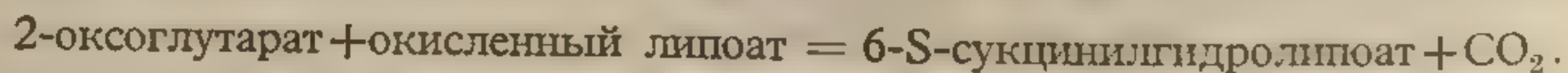
Липоиновая кислота (43). Этот кофермент был обнаружен как заместитель стимулятора роста *L. casei* на синтетической питательной среде. Он также необходим для окисления пировиноградной кислоты. Это 6,8-дитиол-октановая кислота.



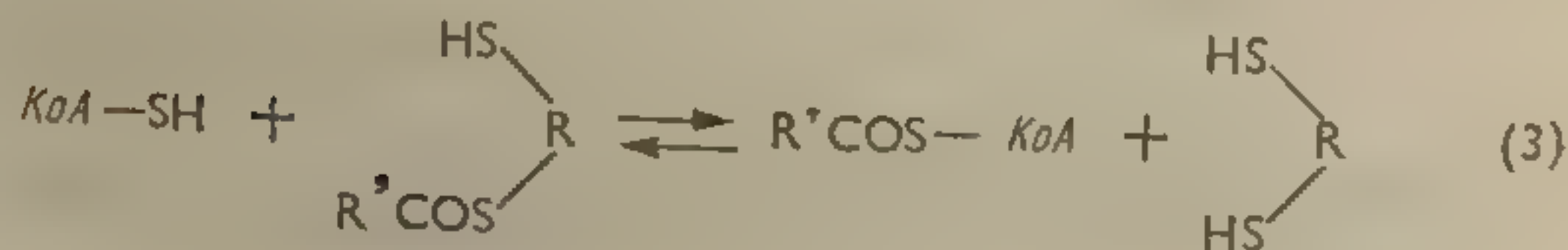
Липоиновая кислота

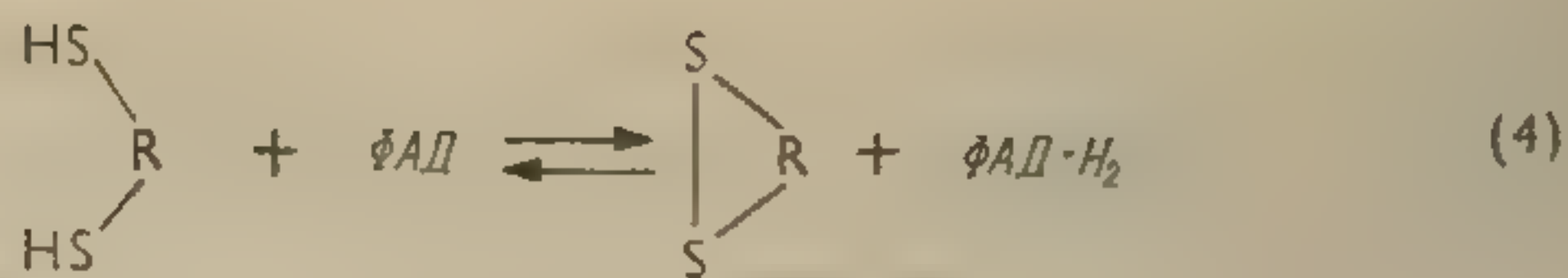
Липоиновая кислота является коферментом аэробного декарбоксилирования пировиноградной и α -кетоглутаровой кислот. Эта реакция останавливается, если специфической гидролазой оторвать кофермент от фермента.

Массы ферментов весьма велики ($4,8 \cdot 10^6$ для пируватоксидазы из *E. coli*, и $2,4 \cdot 10^6$ для кетоглутаратоксидазы). Они являются комплексными соединениями. Часть этого комплекса, содержащая липоиновый кофермент, называется кетоглутаратдегидрогеназой. Катализ идет по следующей реакции:



Эта реакция требует участия особого кофермента, которым является тиаминпирофосфат (ТПФ). Ход реакции с участием обоих коферментов имеет следующий вид:





$\text{R}' = \text{CH}_3, \text{HOOC}(\text{CH}_2)_2$; $\text{R} = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{CO} -$ фермент

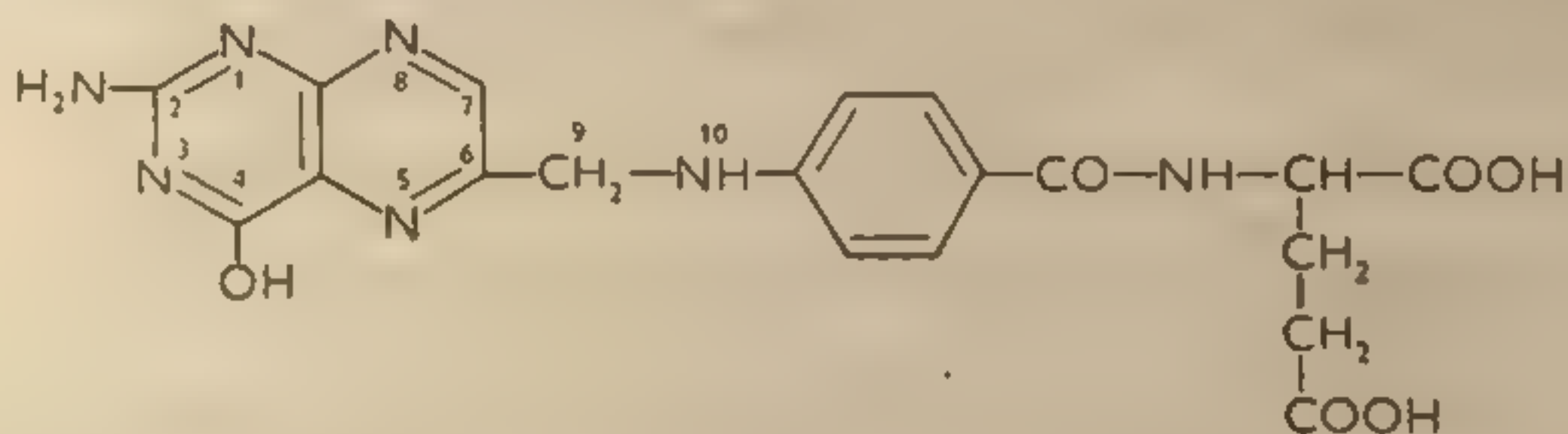
Перевод 6-S-сукцинилгидролшоата в свободный кофермент состоит в обмене, в пределах комплексного фермента, ацильной группы с коферментом А, а затем в восстановлении при содействии $\Phi\text{АД} \cdot \text{H}_2$.

Основная функция липоиновой кислоты заключается в участии ее дисульфидной группы в переносе электронов (и протонов). Этим объясняется чувствительность этого кофермента по отношению к солям трехвалентного мышьяка и обратимость отравления под влиянием BAL. Его роль в переносе электронов ограничена до альфа-кетокислот.

Кофермент становится активным после соединения с апоферментом пептидной связью посредством карбоксильной группы липоиновой кислоты.

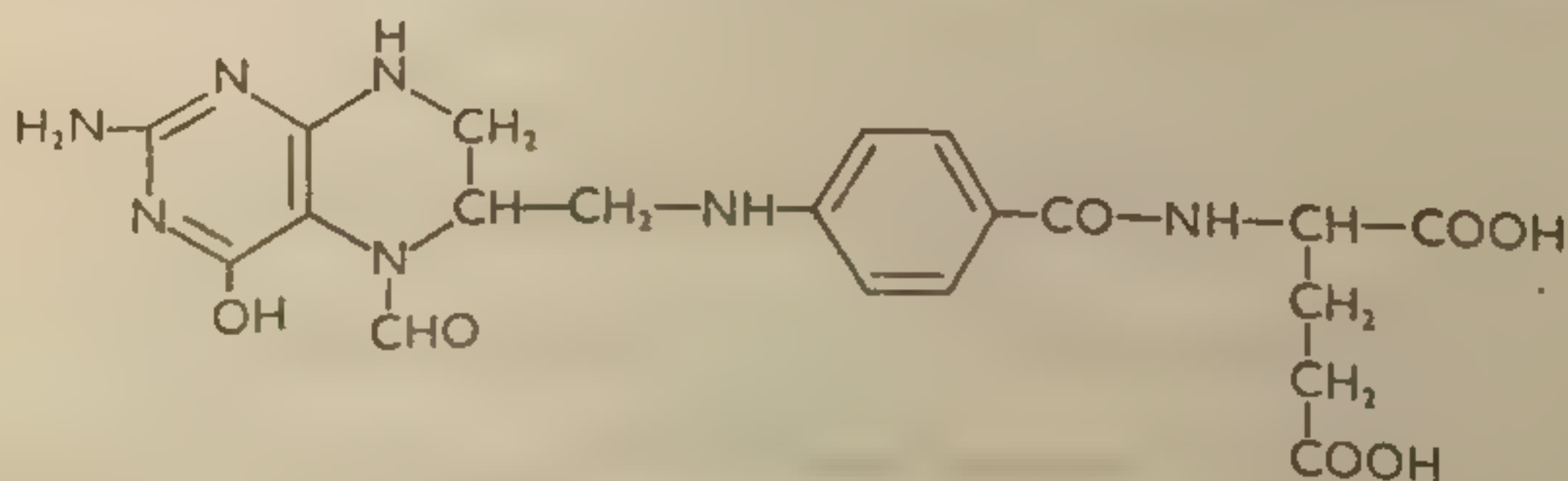
Фолиевая кислота (44, 45). Фолиевая или птероил-глутаминовая кислота встречается в природе в виде многочисленных производных.

Из последних функцию кофермента выполняют гидрогенизированные производные с присоединенной к N_5 или N_{10} формил-группой. Одна из них, фактор роста для *P. cerevisiae* (*citrovorum factor*, CF), является 5-формил-тетрагидрофолиевой кислотой. Однако, она не является коферментом, а его предшественником, переносящим формильную группу.

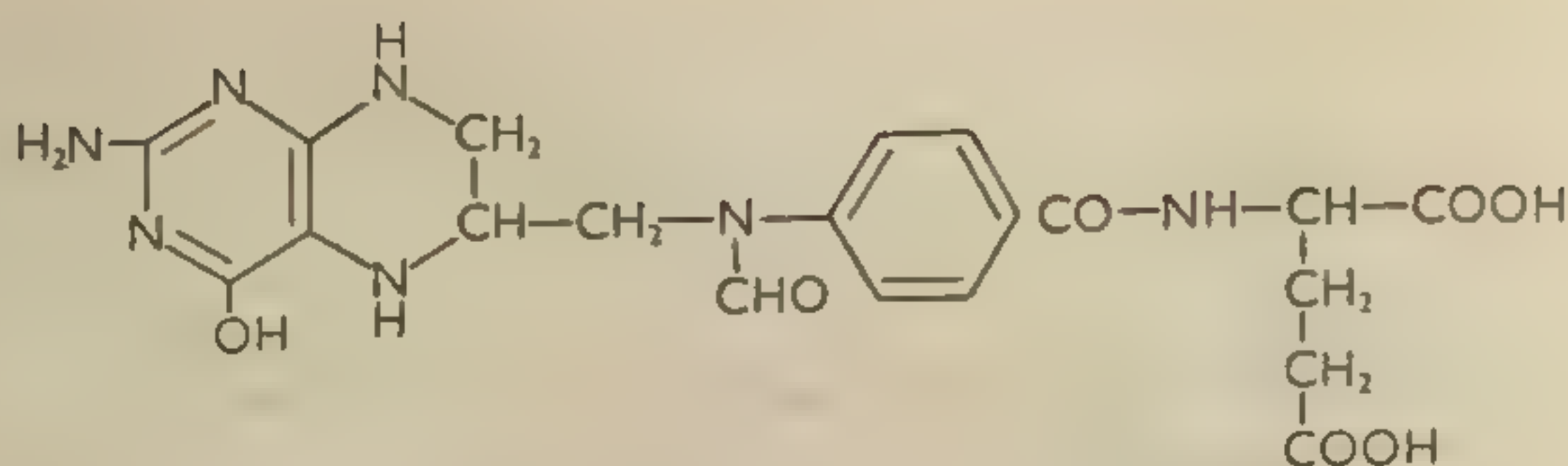


Птероил-глутаминовая кислота

Коферментом является „активный формат“ или N_{10} -формилтетрагидрофолиевая кислота. Он образуется из тетрагидрофолиевой кислоты и формата в присутствии АТФ и соответствующих ферментов. „Активный формат“ получается также из N_5 -формилтетрагидрофолята путем инкубации



N_5 -формилтетрагидрофолиевая кислота



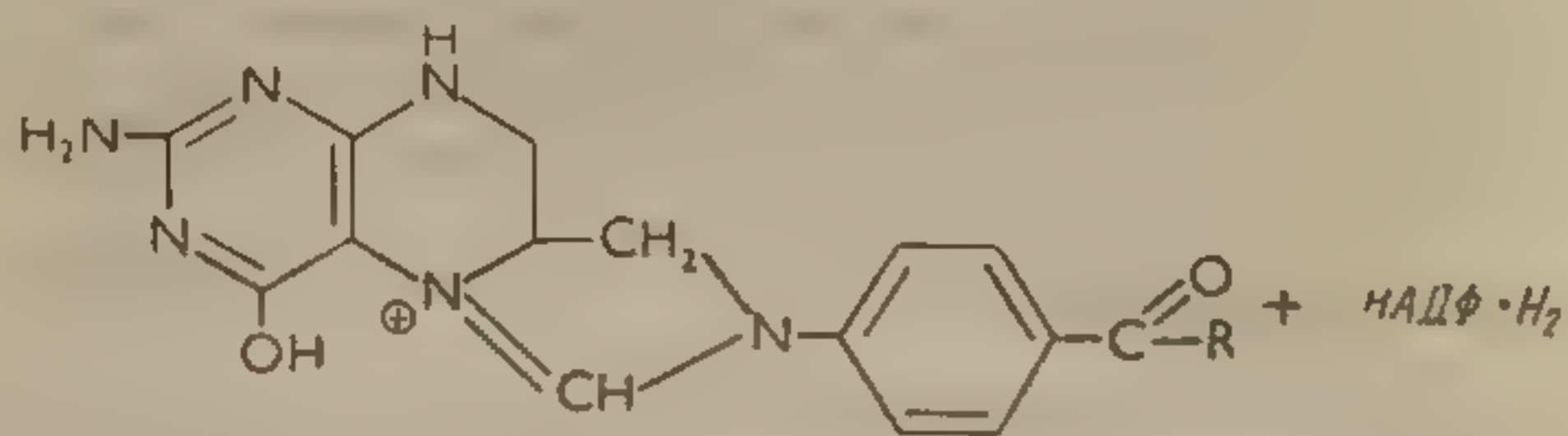
N_{10} -формилтетрагидрофолиевая кислота

его с АТФ. Промежуточным продуктом является N_{5-10} -метенилтетрагидрофолят, переходящий также ферментативно в N_{10} -формилтетрагидрофолят.

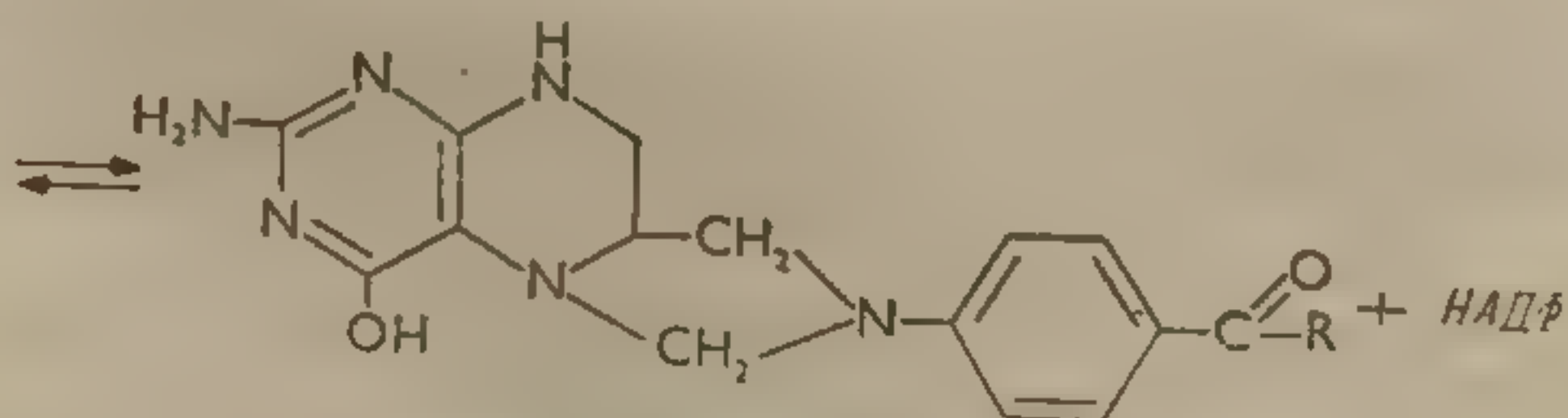
N_{10} -формилтетрагидрофолят входит в состав ферментов, переносящих формильные группы (птеропротеиды), называемые формилтрансферазами. Примером катализируемых ими реакций являются два этапа на пути биосинтеза ядра пурина:

1. 5'-фосфорибозилглицинамид + N_{5-10} -метенилтетрагидрофолят + $H_2O \rightleftharpoons$ 5'-фосфорибозил-N-формилглицинамид + тетрагидрофолят (фосфорибозилглицинамид-формилтрансфераза)
2. 5'-фосфорибозил-5-амино-4-имидазолкарбоксамид + N_{5-10} -метенилтетрагидрофолят + $H_2O \rightleftharpoons$ 5'-фосфорибозил-5-формамидо-4-имидазолкарбоксамид + тетрагидрофолят (фосфорибозил-аминоимидазолкарбоксамид-формилтрансфераза).

В реакциях метилирования глицина в серин принимает участие кофермент приближенной структуры, т.н. „активный формальдегид“. Это N_{5-10} -метилентетрагидрофолят. Он образуется из активного формиата путем ферментативного восстановления при участии НАДФ $\cdot H_2$:



N_{5-10} -метенилтетрагидрофолиевая кислота



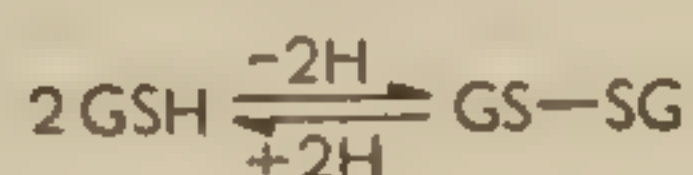
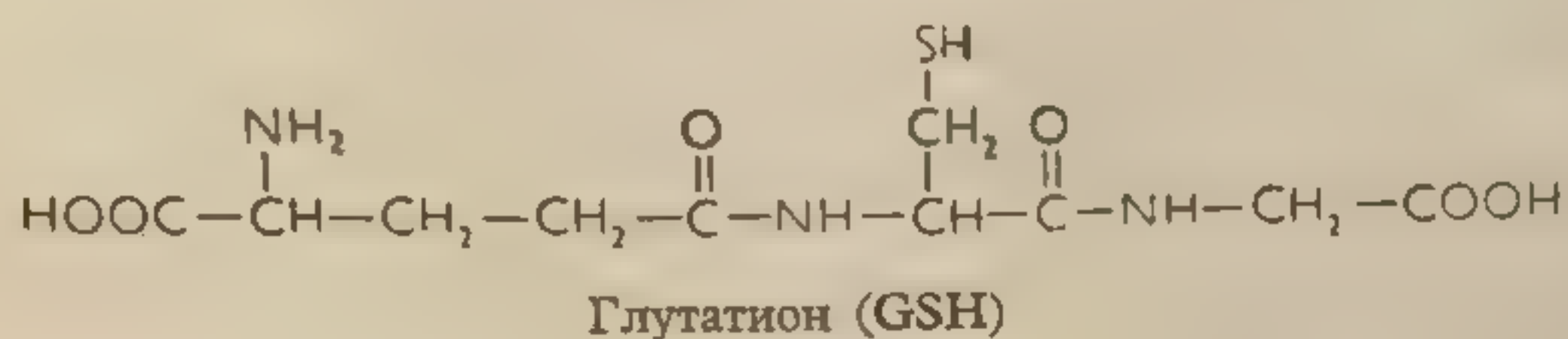
N_{5-10} -метилентетрагидрофолиевая кислота

Этот кофермент принимает участие в следующей реакции:

Глицин + N_{5-10} -метилентетрагидрофолят \rightleftharpoons L-серин + тетрагидрофолят (серин-гидроксиметилтрансфераза).

Гидроксиметильная группа ($-\text{CH}_2\text{OH}$) переносится на глицин. Оба кофермента образуются независимо друг от друга и принимают участие в различных реакциях. Их объединяет перенос одноуглеродных остатков и их присоединение к предшественникам пурина и аминокислот в ходе биосинтеза последних. В этой форме клетки располагают резервом активного одноуглеродного остатка.

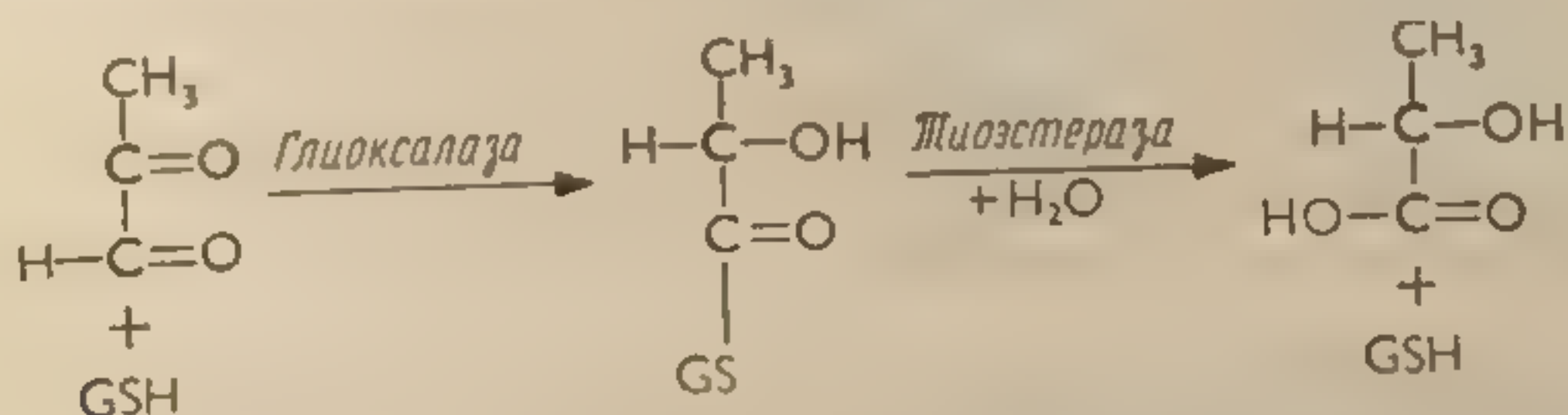
Глутатион (46, 47, 48) представляет собой трипептид, состоящий из глутаминовой кислоты, цистеина и глицина. Он отличается своей структурой от остальных пептидов, так как глутаминовая кислота связана не альфа-,



а гамма-карбоксильной группой. Глутатион встречается в окисленной форме GS-SG и восстановленной форме GSH . В клетках он находится преимущественно в восстановленной форме (10–200 мг%).

Активирование глутатионом ферментативные реакции, еще не указывает на его роль в переносе атомов водорода. Это значит что он не входит в цепь клеточного дыхания. Только в одном случае удалось обнаружить глутатион в качестве простетической группы. Это глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Ферментативная функция этой группы оспаривается.

Глутатион является коферментом ферментной системы (глиоксалаза I и II) превращающей метилглиоксаль в молочную кислоту в печени.

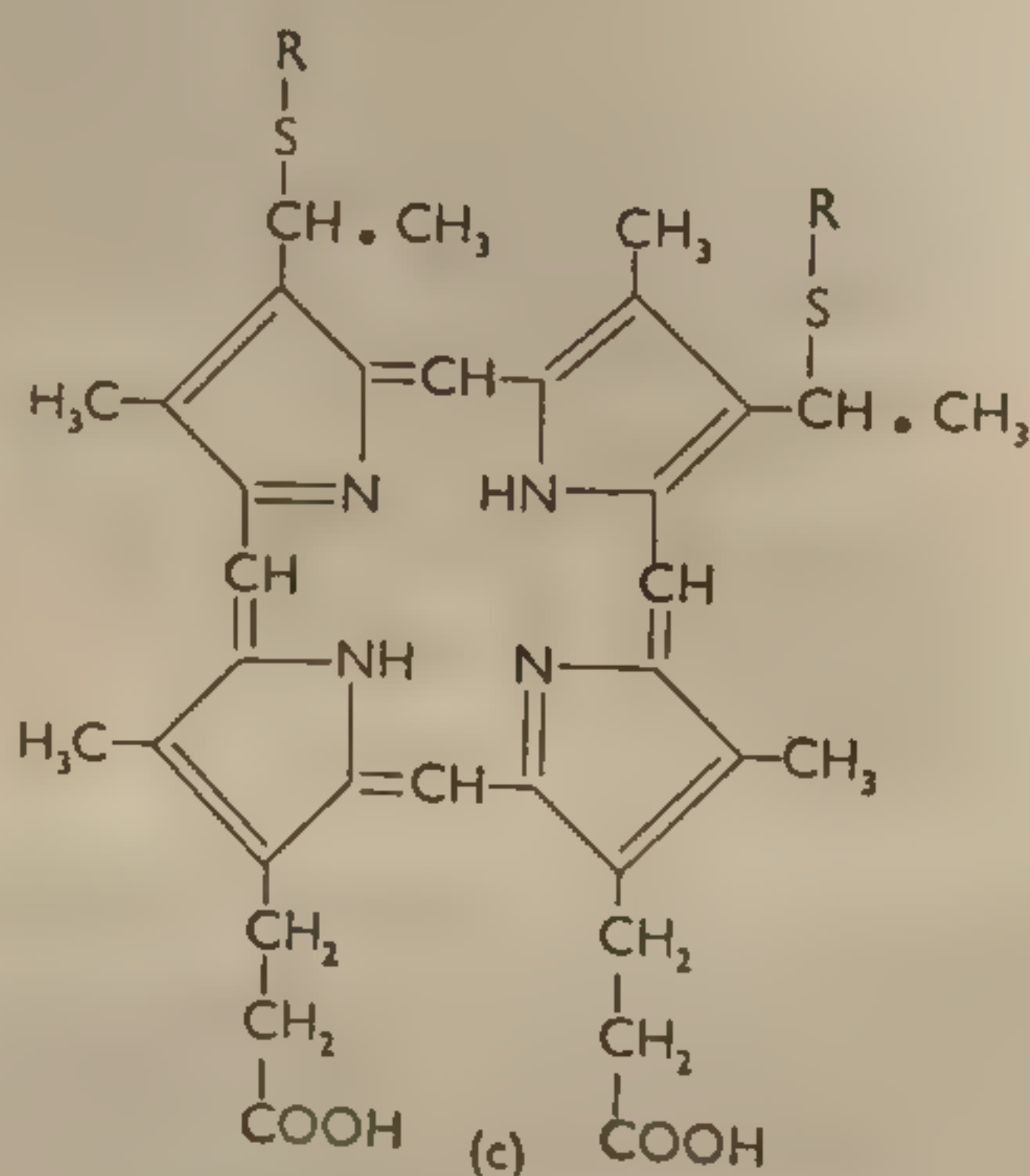
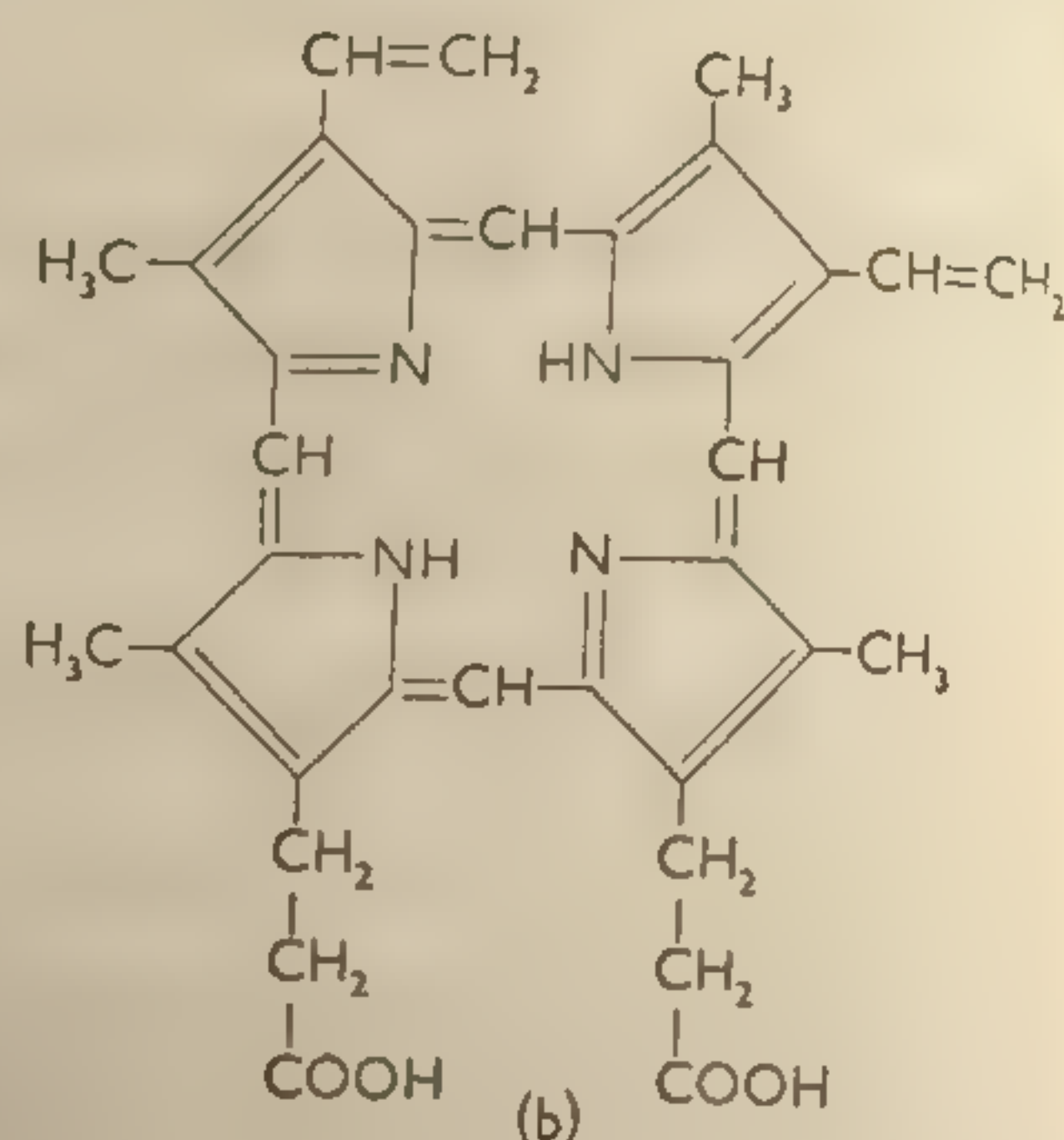
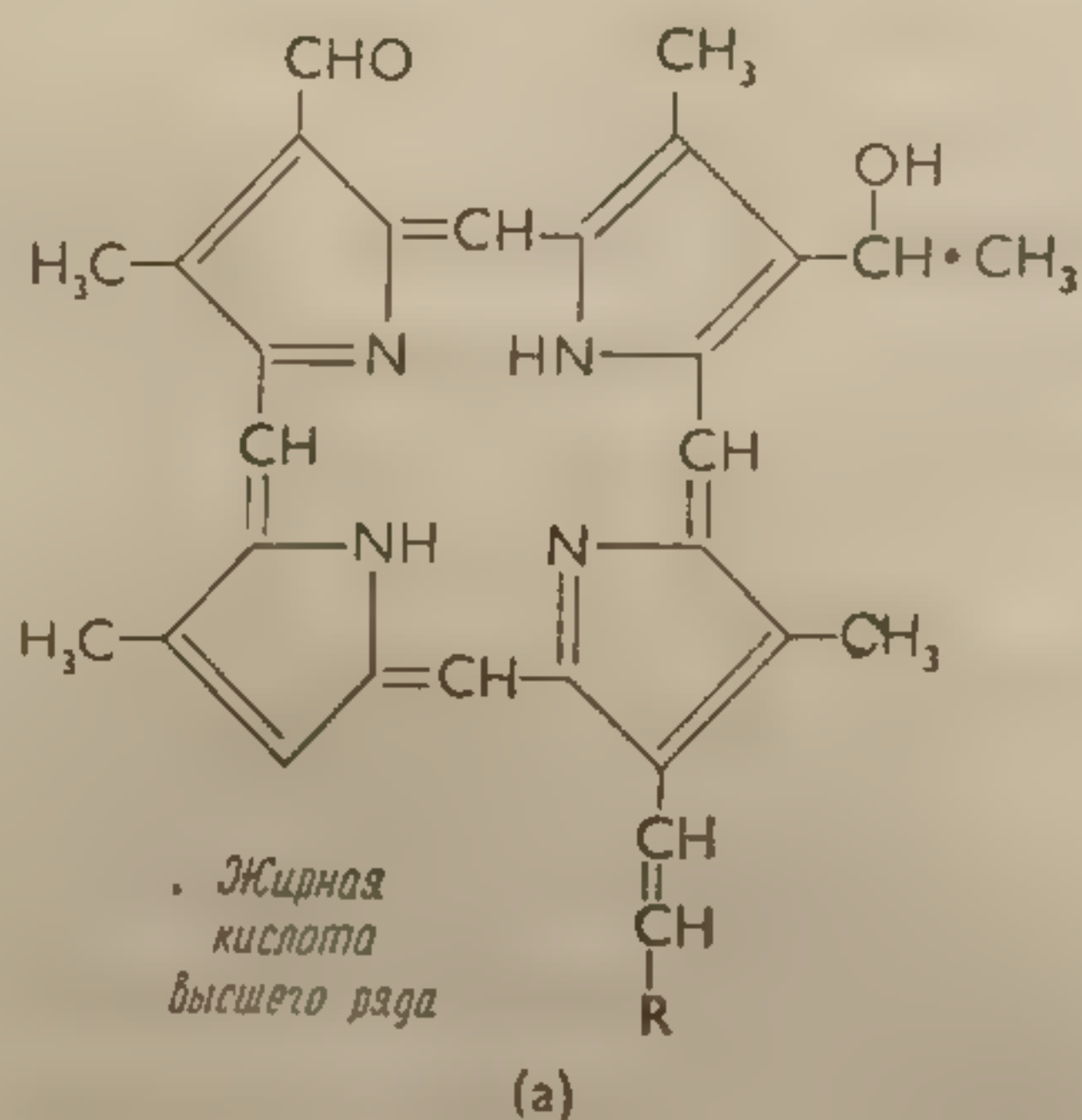


Особой ферментативной функцией зависимой от восстановленного глутатиона, является *cis-trans* изомеризация малеилацетоацетата в фумарилацетоацетат. Другая реакция состоит в окислении формальдегида в присутствии пиридинового фермента типа дегидрогеназы с НАД в качестве простетической группы. GSH не связывается и не окисляется в этой ферментативной реакции, но несмотря на это, он специфически ее активирует вплоть до разведения $3 \cdot 10^{-6}$ М. Изучение кинетики этой реакции подтвердило постулированный механизм, в котором промежуточным продуктом является тиол-эфир муравьиной кислоты или формил-SG.

Гемопротейдные коферменты (49, 50). Это простетические группы таких гемопротейдных ферментов как каталаза и пероксидаза, а также гемопротейды, входящие в состав группы цитохромов, которые по действию равноценны коферментам. Цитохромы являются белками, но их не считают ферментами, несмотря на то, что их простетическая группа родственна таким же

группам каталазы и пероксидазы. Сами по себе они не обладают каталитическими свойствами и требуют наличия соответствующего фермента для проявления этих свойств (например цитохром-редуктазы или цитохром-оксидазы).

Простетические группы гемопротеидных ферментов и цитохромов содержат железопорфирины, производные протопорфирина IX. В цитохромах находятся три производные протопорфирина IX, принадлежащие к типу а, б и с.



Протопорфирины цитохромов

Цитохромы идентифицируются по абсорбционному спектру, особенно в восстановленной форме. Способность принимать окисленную или восстановленную форму, что выражается степенью окисления атома железа, является основой их функции, т.е. переноса электронов в процессе биологического окисления. Цитохром с, масса которого равняется около 13000, изученный в химическом отношении лучше других, обладает лишь одной гемовой группой, т.е. способен переносить один электрон.

Гемовая простетическая группа связывается с белком тройным образом. Одним из способов является связь с центральным атомом железа с координационным числом 6, вторым — слабые связи между карбоксильными группами остатка пропионовой кислоты в положении 6 и 7 порфирина и белком. Третий род связи иногда образуют другие боковые цепи, из которых заслуживают внимания тиозфирные связи между винильными группами протогема и цистеиновыми остатками белка в цитохроме с.

Если в пероксидазе из хрена заменить простетическую группу, которой является протогем, производными, содержащими другие порфирины, ферментативная активность по отношению к природной, принятой за 100, становится для мезопероксидазы 132, гематопероксидазы — 130, для дейтеропероксидазы — 50, а для диацетилпероксидазы — 2 (51).

Цитохромы b обладают способностью реагировать с молекулярным кислородом. Все другие требуют для реакции с кислородом участия цитохром-оксидазы, простетическая группа которой (еще не полностью изученная) принадлежит к этиопорфирину IX. Кроме этой группы, для функции переноса электронов на O_2 , по-видимому имеет значение присутствие меди, находящейся в относительно большой концентрации в препаратах цитохром-оксидазы.

Металлы в качестве коферментов (52). Почти все ферментативные реакции, изучаемые *in vitro* в большей или меньшей степени активируются ионами некоторых металлов. Их участие в механизме ферментативного катализа подтвердилось кинетическими исследованиями, а необходимость сохранения металла в структуре простетической группы была доказана для несложных групп ферментов. Первой из цинксодержащих ферментов была открыта карбоангидраза, следующей — карбоксипептидаза A. Ряд пиририновых ферментов содержит в молекуле атомы цинка, например алкогольдегидрогеназа из печени — 2, из дрожжей — 4.

Особенно распространенным типом активации ферментов металлами являются активации ионом магния. Этот ион активирует, как правило, все ферменты, переносящие фосфатные или фосфорильные группы с АТФ на АДФ. Фосфатазы также нуждаются в подобной активации. Марганец обычно заменяет магний. Ион магния активирует также ферменты типа декарбоксилазы α -кетокислот и некоторые пептидазы. Фосфопируват-гидратаза (енолаза) бесспорно является магнипротеидом (53) и в присутствии фосфорнокислого и фтористого ионов теряет активность вследствие образования магний-фтор-фосфатного комплекса.

Vallee (52) проводит различие между истинными металлоферментами и ферментами. В первом случае ион металла выполняет свою роль в соединении с белком. Во втором случае комплекс белок-металл не является активатором. Активация может быть осуществлена например посредством образования комплекса металл-субстрат, как было доказано для фосфоглицераткиназы.

Вообще активирование ферментов ионами металлов характеризуется небольшой специфичностью. Например енолаза проявляет активность в присутствии некоторых двухвалентных ионов, как Mn^{++} , Zn^{++} или Fe^{++} . Другие металлы неактивны, а некоторые даже ингибируют, как Ca^{++} . Карбоангидраза вола является металлоферментом, сильно связывающим Zn^{++} . Она расщепляется при pH 5 под влиянием хелирующих факторов. Освобожденный от цинка и неактивный апофермент активируется не только Zn^{++} , но также Co^{++} , Fe^{++} и Ni^{++} . Относительные активности этих не природных металлоферментов, содержащих по 1 молю иона на 1 моль белка составляли 100, 40, 10 и 5.

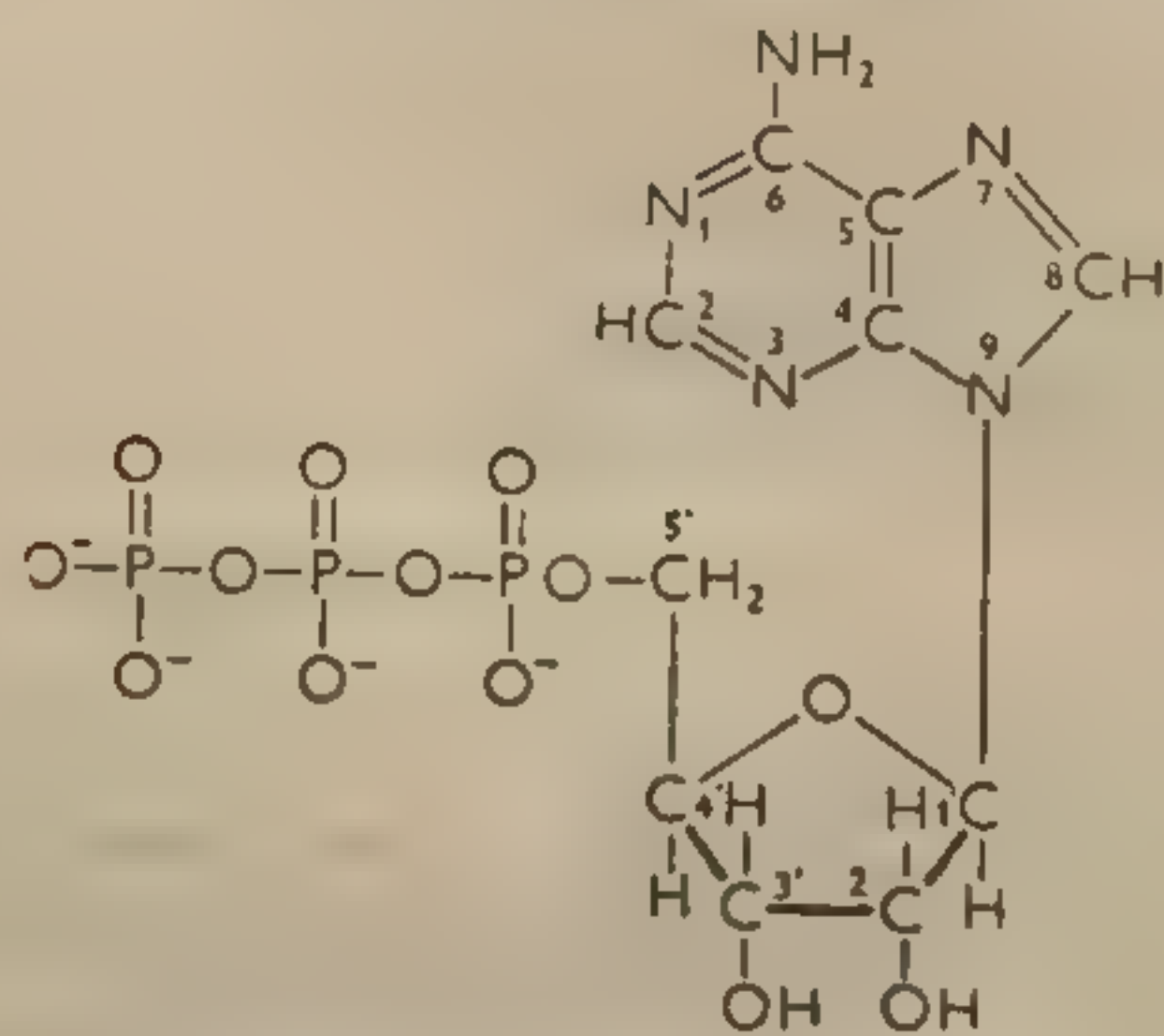
Вопросы связывания металла и его участия в функции каталитического центра имеют основное значение для понимания механизма биологического катализа.

Адениннуклеотиды (57). Описанные выше коферменты представляют собой простетические группы ферментов. Их роль состоит в переносе определенных атомов или химических групп. Это свойство коферментов проявляется также в реакциях, при которых не обнаружено связи кофермента с белком в качестве простетической группы. Соединение считают коферментом, если оно обладает способностью ускорять или обуславливать ферментативную реакцию, так как ферментативная реакция требует, кроме специфического фермента, обеспечения энергией, а также наличия донора или акцептора переносимых химических групп.

Нуклеотиды соответствуют обоим условиям. В форме дифосфатов они являются акцепторами фосфатных групп при многих реакциях их переноса, а в виде трифосфатов донорами энергии в зависимости от того, идет ли экзотергическая или эндотергическая реакция.

Эти функции наблюдаются в изолированных реакциях, исследуемых в системе: фермент плюс субстрат плюс адениннуклеотид (АТФ или АДФ) плюс (необязательно) активатор (Mg^{++}). Реакции протекают в стехиометрических отношениях и прекращаются в определенном положении равновесия. Иначе бывает *in vivo* при наличии многоферментных систем, связанных между собой общими субстратами и переносом энергии. При этих условиях уровень нуклеотидов и их взаимоотношение постоянны, т.к. они регенерируются в ходе обратных реакций. Например в одной реакции АТФ служит донором фосфатной группы, и одновременно поставляет энергию, необходимую для переноса этой группы. В другой реакции образующийся АДФ присоединяет фосфатную группу и достигает энергетического уровня АТФ.

При гармоничном течении промежуточного обмена адениннуклеотиды не изменяются на вид, ни в количественном, ни в качественном отношении



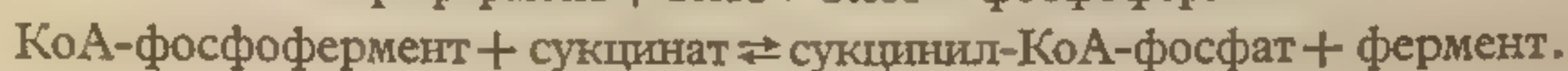
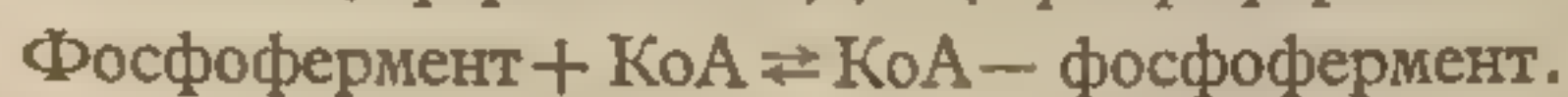
Аденозинтрифосфат (АТФ)

и их соотношение, определенное аналитическим путем, является постоянным. Однако поскольку благодаря их присутствию ускоряются реакции, они отвечают критериям коферментов, хотя они и слабо связаны с белком. В этом отношении разница между коферментом, простетической группой и субстратом стирается, и химической группе, действие которой напоминает классическую функцию кофермента, присваивают это наименование.

Нуклеотиды являются коферментами всех реакций переноса фосфатных

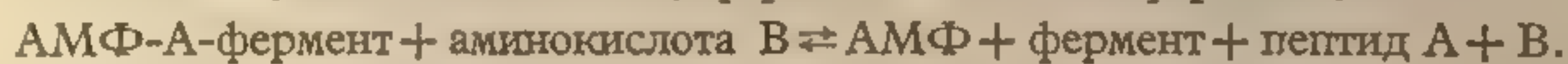
групп. В количественном отношении на первом месте находятся адениннуклеотиды, т.е. АТФ, АДФ и АМФ.

Большинство реакций биосинтеза приводится в движение путем энергетического сочетания с нуклеотидными полифосфатами. Преимущественно сочетаются два ферментативных процесса; один из них ускоряется фосфокиназой, а второй — фосфорилазой или пирогосфорилазой. Фермент участвует в каждом этапе реакции в стехиометрической пропорции по отношению к нуклеотиду. Принимается, что в реакционном механизме участвуют нестойкие соединения фермента с нуклеотидом или частью последнего: комплекса фермент-АМФ или фермент-фосфат. Например трехэтапный синтез сукцинил-КоА протекает следующим образом:



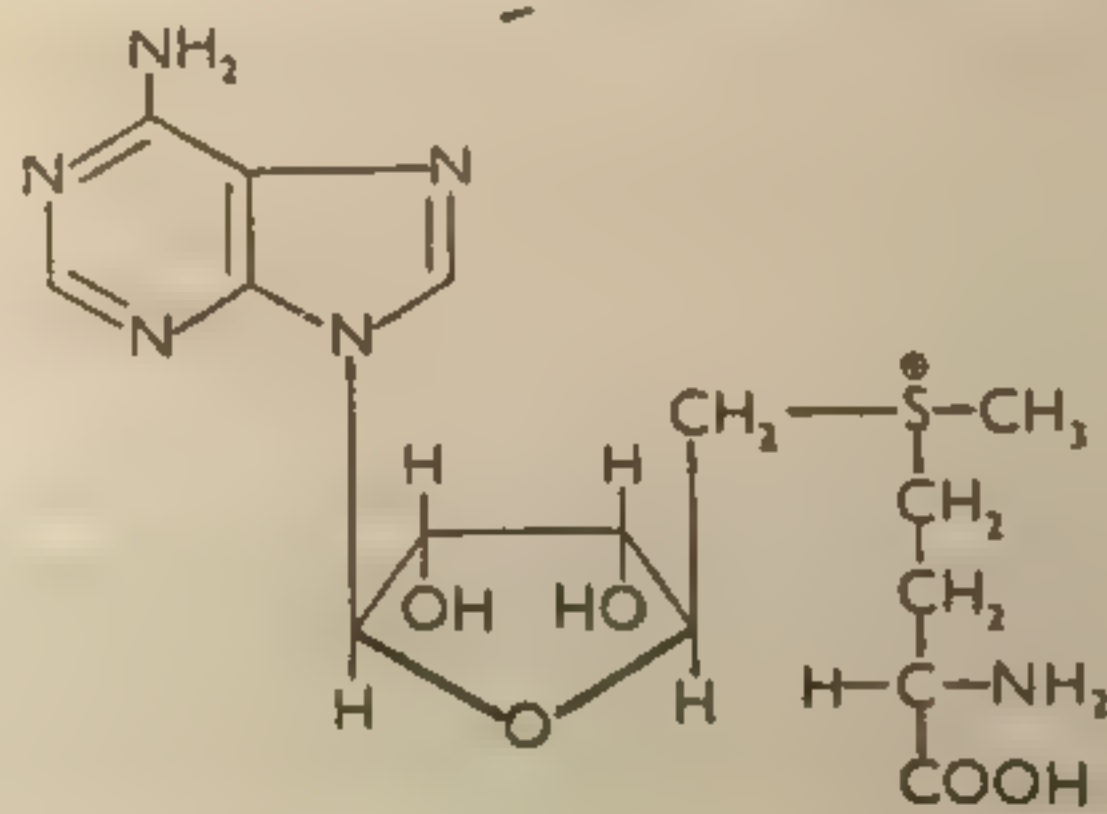
На каждом этапе необходим магний и на каждом этапе происходит перенос фосфатной группы, активируемой связью с ферментом за счет разрыва связи в АТФ.

Многочисленные реакции переноса фосфатной и пирогосфатной групп зависят от АТФ, донора той и другой. Кроме того, в присутствии АТФ протекают все реакции синтеза, в которых образуются новые ковалентные связи между атомами углерода или атомом углерода и кислорода, серы или азота. Примером реакции синтеза этого типа является активирование аминокислот и соединение их между собой на матрице рибонуклеиновой кислоты. Общий механизм этой реакции имеет следующий вид:



При реакции этого типа образуются длинные цепи полипептидов из многих аминокислот.

Роль АТФ в таких реакциях состоит в том, что он является донором аденильной группы, и одновременно поставляет энергию для активации субстрата в данной ферментативной реакции, вследствие чего образуется нестойкий и весьма реактивный аденилат аминокислоты (АМФ-А).

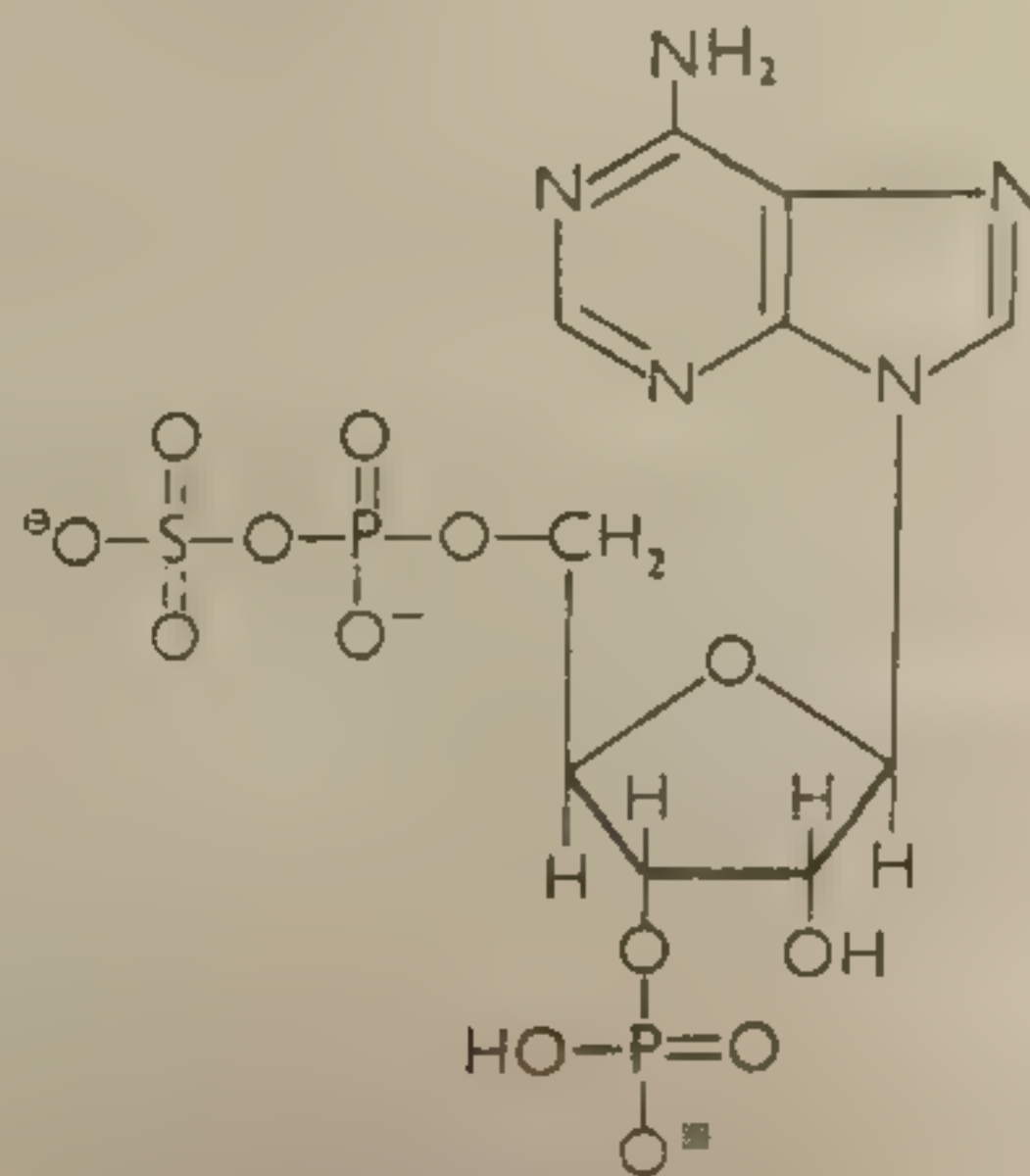


S-аденозилметионин („активный метил“)

Если АТФ является главным донором фосфатных или аденильных групп в метаболизме, то АДФ играет роль главного акцептора фосфатных групп.

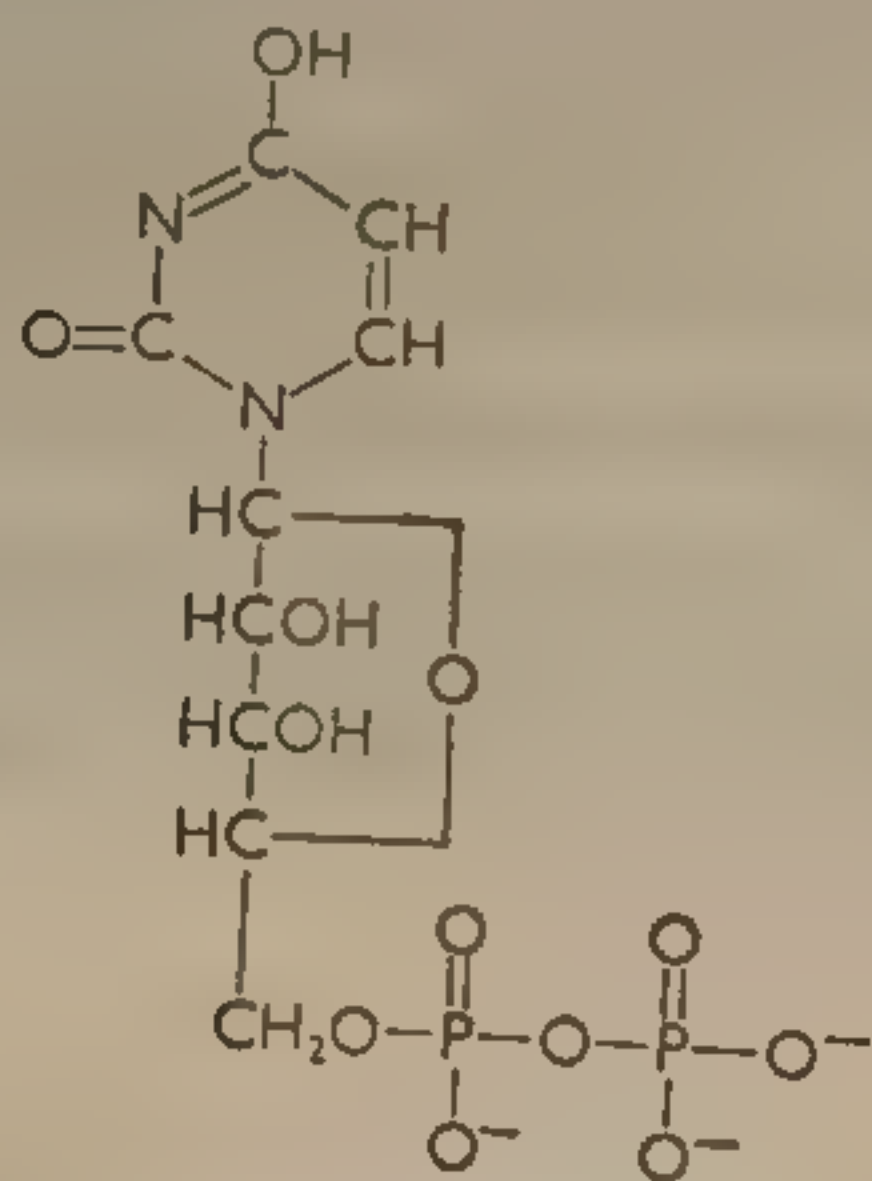
Коферментом реакций переноса метильных групп является аденозилметионин. Т.н. „активный сульфат“ (3'-фосфоаденозин-5'-фосфорилсульфат) пред-

ставляет собой кофермент реакций переноса сульфатной группы. При реакциях этого типа возникают сернокислые эфиры аминсахаров, сульфатиды и сульфаты фенолов.

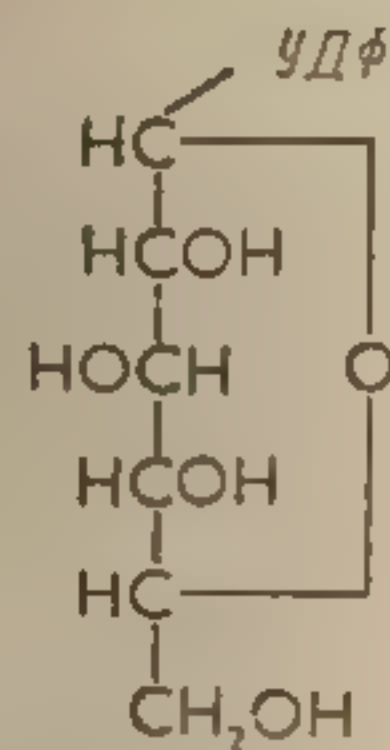


Активный сульфат

Уридинуклеотиды (54). Это коферменты обязательно присутствующие в клетках; они катализируют синтез и распад сахаров, а также окисленных и восстановленных производных последних. Они встречаются под видом уридинмоно-, ди- и трифосфатов.

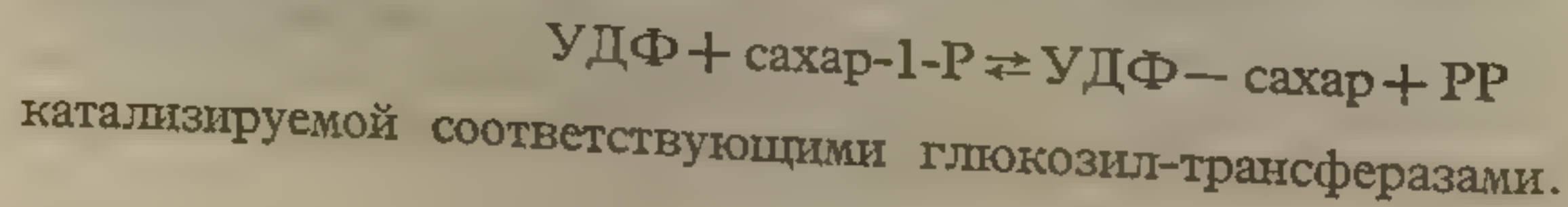


Уридиндифосфат (УДФ)

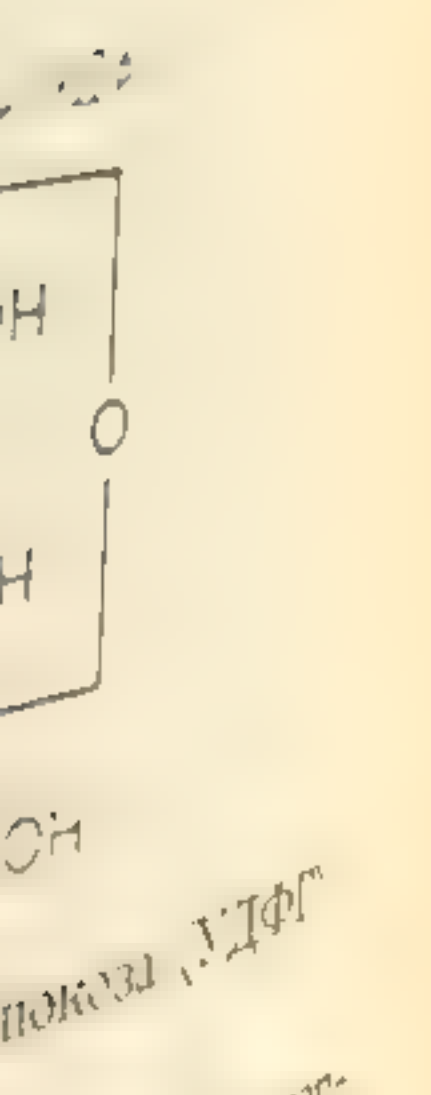


Уридиндифосфоглюкоза (УДФГ)

Уридиндифосфат (УДФ) является составной частью соединений, содержащих простые сахара, аминсахара, мочевые кислоты, а также их сульфаты или фосфаты. Знаменательным свойством многочисленных соединений УДФ является высокая свободная энергия гидролиза, это позволяет относить их к категории высокоэнергетических соединений, особо реактивных в термодинамическом отношении. Из этих соединений центральное место в метаболизме занимает УДФ-глюкоза (УДФГ). УДФ-сахара образуются ферментативно в реакции:



...призывает
...а также
...встречаясь с

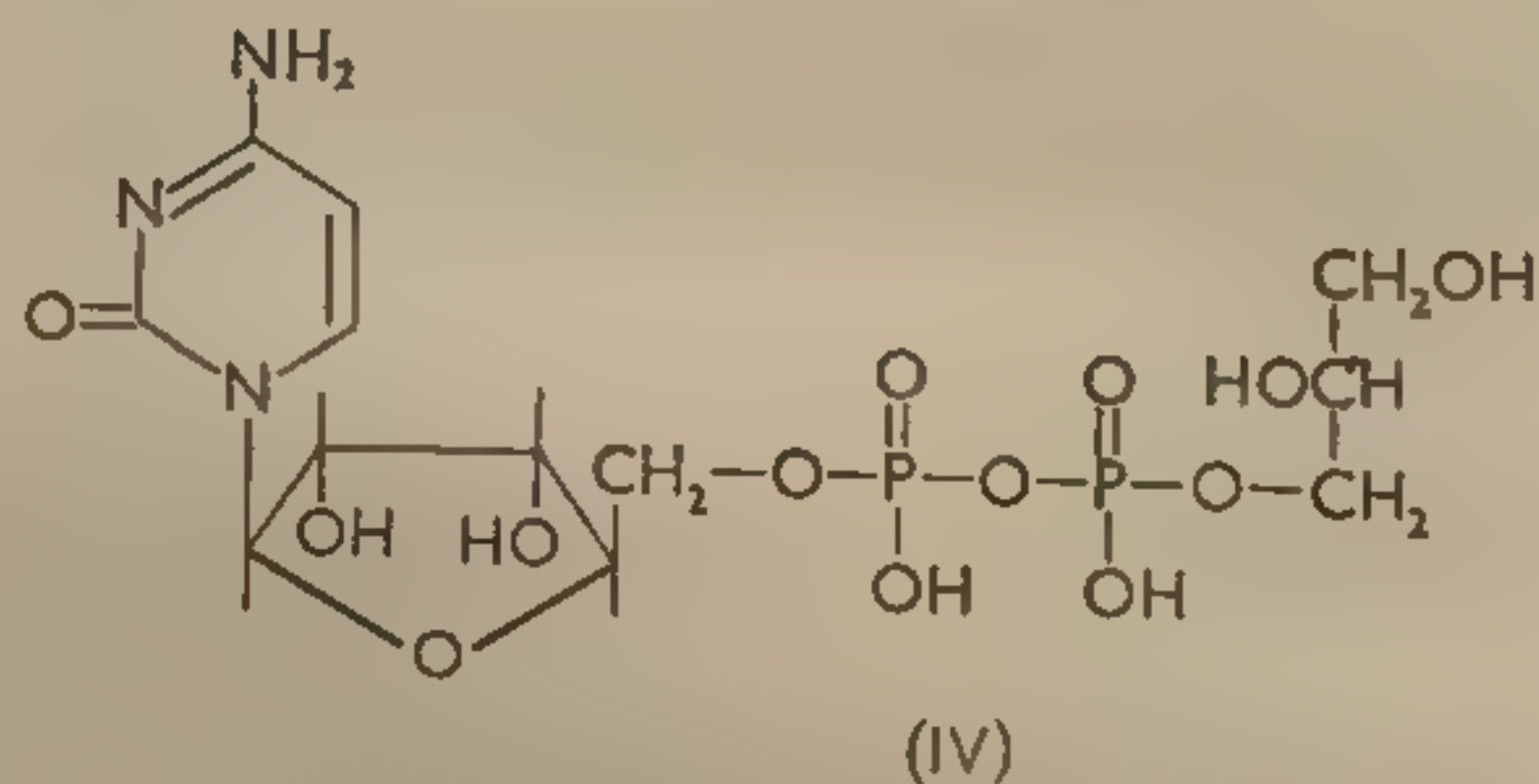
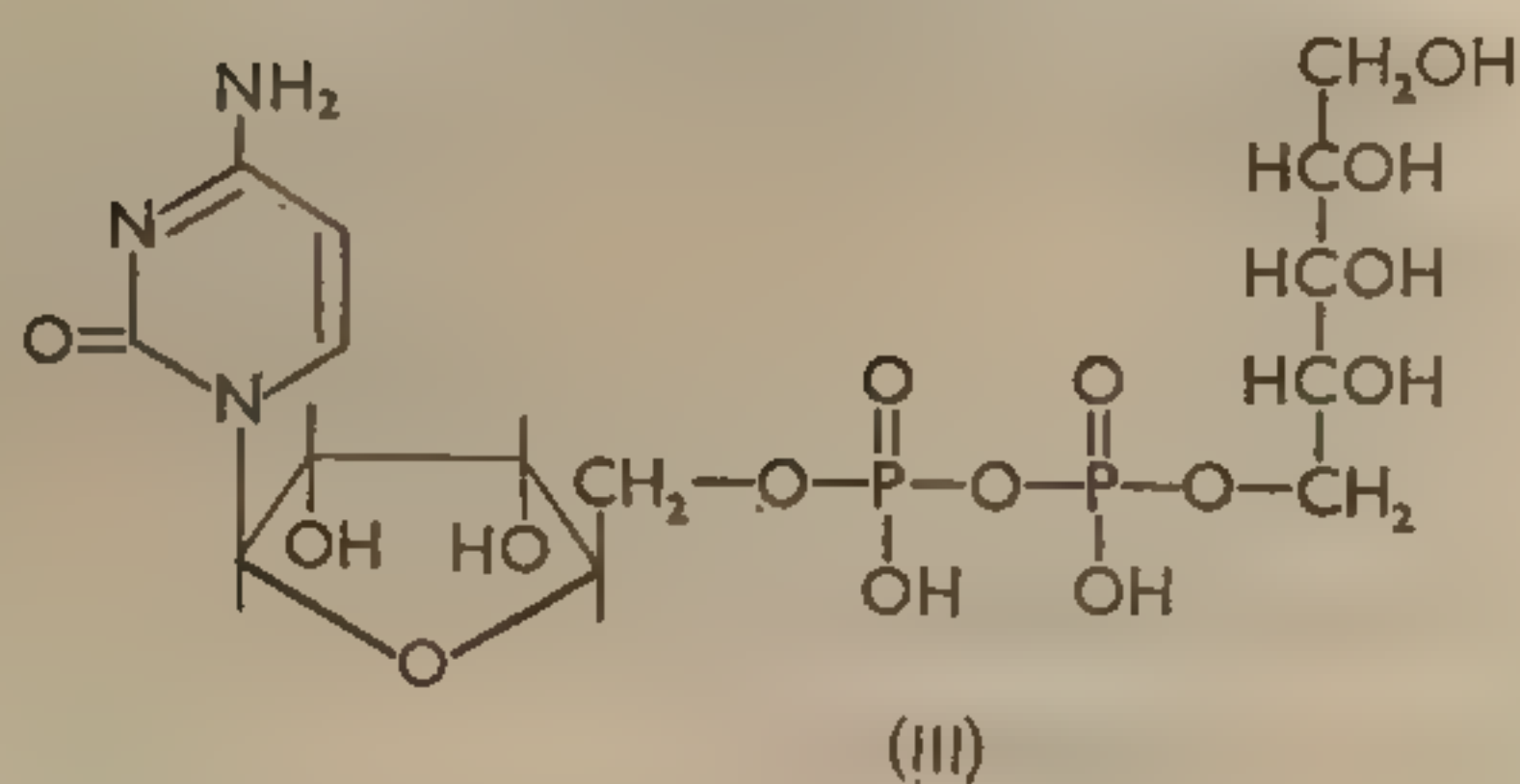
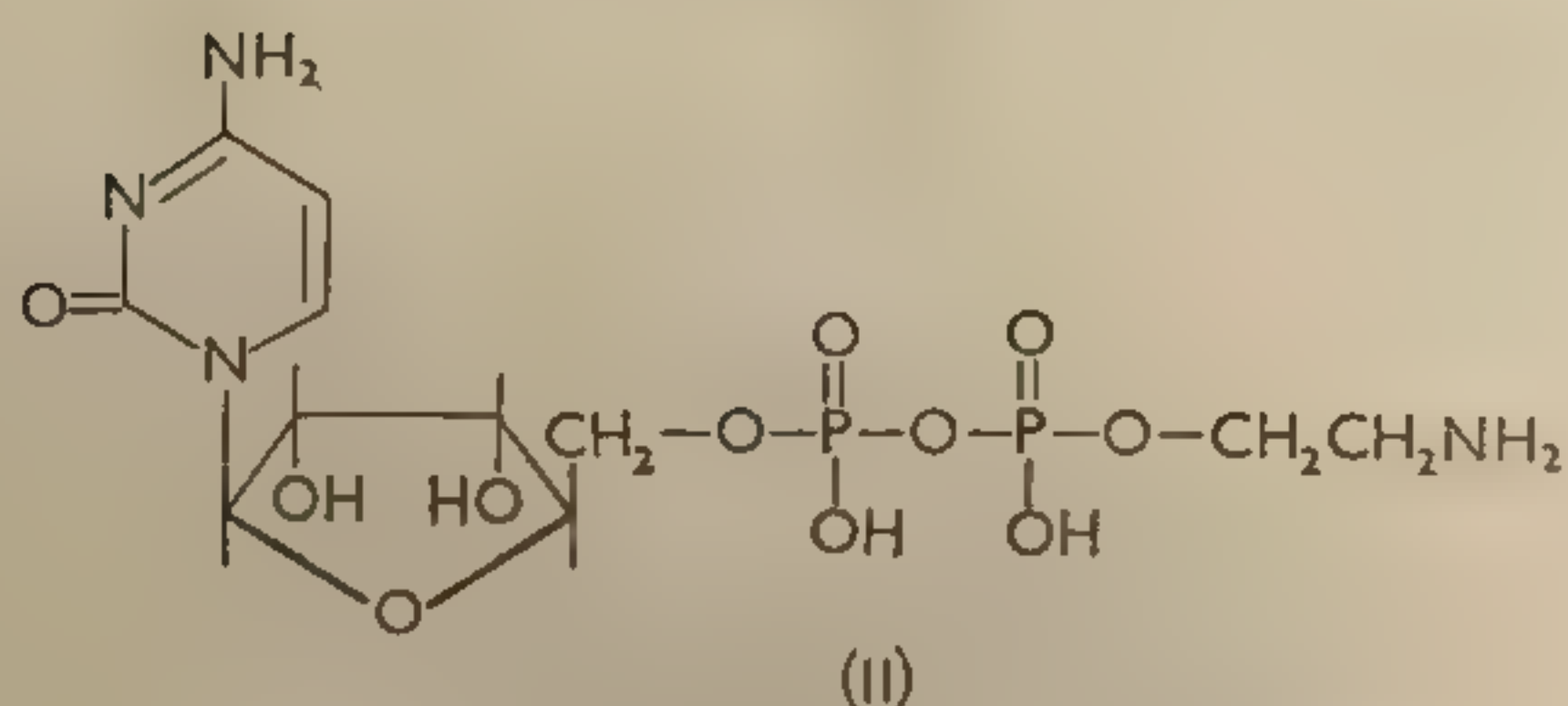
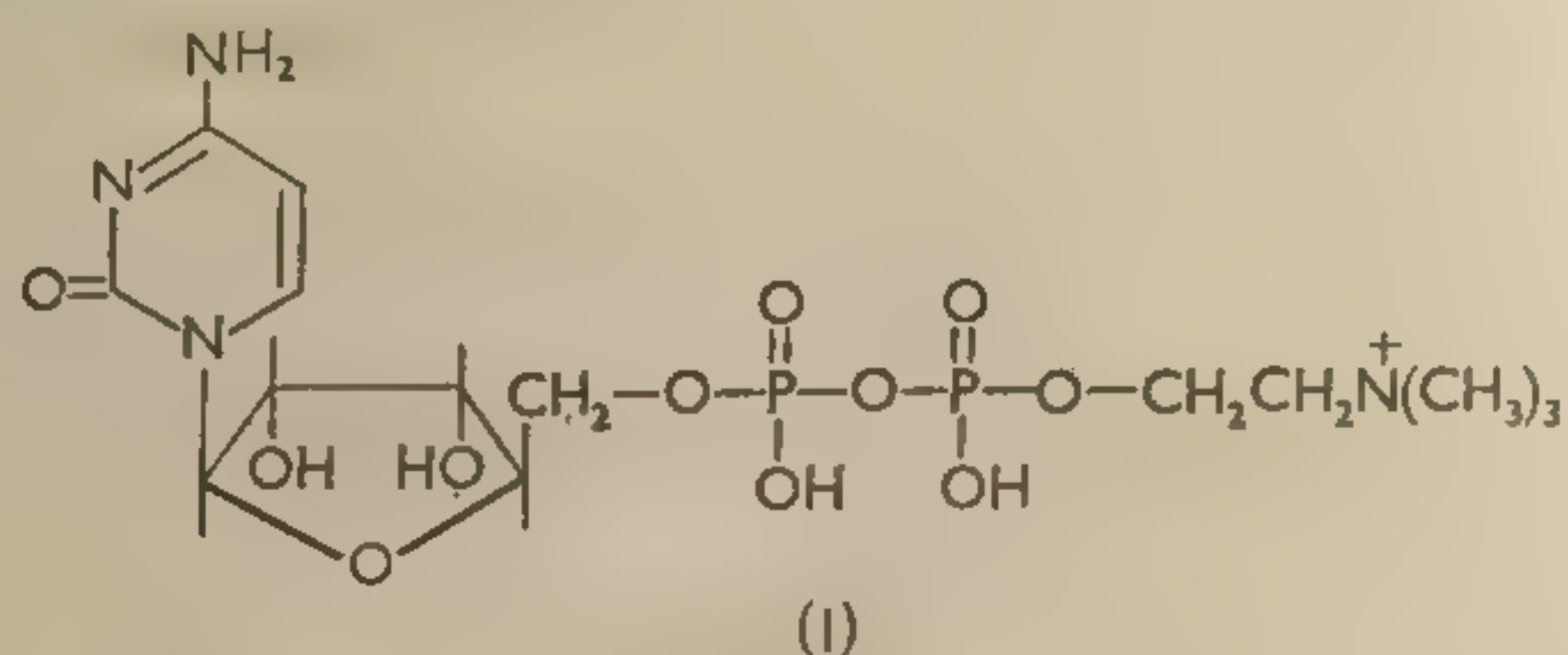


показу УДФ

...иений, содер-
же их сульфиды
динений УДФ
ет отказать их
ных в терми-
место в мета-
ются фермен-

100

мина в реактивное ЦДФ-производное при участии специфических ферментов. Реактивные формы азотных оснований и сахаров изображены формулами:



Реактивные формы азотных оснований и сахаров: (I) ЦДФ-холин; (II) ЦДФ-этанол-амин; (III) ЦДФ-рибитол; (IV) ЦДФ-глицерин

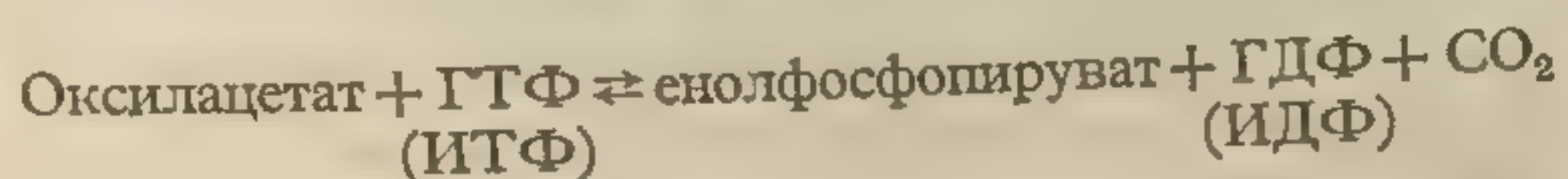
Под влиянием специфических трансфераз активные связи кофермента с азотным основанием или сахаром переносятся на соответствующие акцепторы. Например особая трансфераза переносит активную группу фосфорил-холина на α , β -диглицерид, в результате чего образуется лецитин:



Образующийся при этой реакции ЦМФ повторно фосфорилируется АТФ (особая ферментативная реакция) в ЦТФ. Таким образом выполняется условие обновления каталитически активного кофермента.

Гуанозиннуклеотиды (56). Роль кофермента выполняет гуанозинтрифосфат, ГТФ. Он реагирует в присутствии специфической пироглутаматкиназы с маннозо-1-фосфатом и образует гуанозиндифосфоманнозу (ГДФ-манноза).

ГДФ является акцептором фосфата в реакции связывания неорганического фосфора в ходе окисления α -кетоглутаровой кислоты в цикле лимонной кислоты. Также и одна из узловых реакций сахарного обмена, карбоксилирование фосфопировиноградной кислоты в щавелевоуксусную кислоту, зависит от ГТФ (или инозинтрифосфата, ИТФ).



ГТФ является единственным активатором реакции фосфорилирования инозиновой кислоты в положении C_6 .

В настоящее время участие ГТФ в биосинтезе белков считается доказанным, так как прибавление этого фермента увеличивает в 10 раз внедрение аминокислот в белки микросом. Участие ГТФ проявляется лишь на одном этапе этого синтеза, а именно, в переносе аминокислоты связанной с мелкомолекулярной РНК на пептидную цепь.

ТЕХНИКА ИЗОЛИРОВАНИЯ И ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ

Учение о ферментах включает технику изолирования и получения их в чистом виде. Поскольку ферменты являются белками, их очищают теми же методами, которые применяются при изолировании и фракционировании белков. Обзор этих методов находится в книге Schwimmer и Pardee и в коллективном труде о методах в ферментологии (редакторы Colowick и Kaplan, 59).

При изолировании и очистке ферментов необходим такой подбор методов, который позволяет получать ферменты в гомогенном состоянии, без нарушения их каталитической активности. Ферменты преимущественно нестойки при рН ниже 5 и выше 9. Они подвержены термической денатурации, если температура превышает 45°C и поверхностной денатурации (например при вспенивании растворов). Они теряют активность, в большинстве случаев необратимо, в присутствии солей тяжелых металлов. Поэтому экстракты ферментов готовят и фракционируют при низких температурах. Их экстрагируют и растворяют в бидистиллированной воде или добавляют к воде средства, связывающие тяжелые металлы в комплексы (этилендиамин, тартрат, пироглутат и пр.). Очистку ферментов производят в буферах с рН близким к нейтральному. Для сохранения каталитической активности к ферментам прибавляют восстановители (цистеин или тиоловые соединения). Во многих случаях прибавление субстрата в значительной концентрации предохраняет фермент от необратимой инактивации.

Большинство белков, обладающих ферментативной активностью, экстрагируется водой или разведенными растворами солей при рН, отдаленном от их изоэлектрической точки. Это относится в первую очередь к растворимым ферментам, находящимся в цитоплазме.

Часть ферментов однако связана с субмикроскопическими структурами клеток, а именно с митохондриальными мембранами и перегородками, аппара-

ратом Гольджи, зернистостями, а также с нерастворимыми белковыми, липидными и полисахаридными комплексами. Их освобождение требует разрушения клеточной субструктуры или диссоциирования комплекса. Это производится физическими или химическими методами.

Ферменты экстрагируются обычно из механически разрушенных клеток, после предварительного размола тканей. Отделение ферментов, сильно связанных с зернистостями и нерастворимыми клеточными структурами, требует таких приемов, как замораживание и размораживание, экстрагирование бутанолом, вызывающим диссоциацию белково-липидных комплексов, приготовление ацетоновых порошков путем осаждения взвеси или тканевого гомогената. Применяются также средства, снижающие поверхностное напряжение, как дезоксихолят и синтетические детергенты, что способствует отделению ферментов от нерастворимых клеточных преципитатов и мембран.

Для получения фермента из ткани часто приходится прибегать к спонтанному или управляемому аутолизу. При воздействии собственных тканевых или прибавляемых препаратов протеолитических ферментов облегчается экстрагирование ферментов, неразложенных в ходе протеолиза.

Процесс очистки ферментов, следующий за их извлечением, контролируется ферментативным тестом. При помощи этого теста осуществляется количественный контроль очистки фермента отделение тех фракций, в которых он находится. Содержание фермента обычно выражают в условных единицах удельной активности, т.е. число единиц в 1 мг белка. В процессе очистки удельная активность растет до известной максимальной величины.

Методы очистки и фракционирования ферментов весьма разнообразны. Чаще всего для фракционирования пользуются растворами различных солей, особенно сернокислым аммонием, и органическими растворителями, главным образом ацетоном, спиртом при низкой температуре или эфиром.

Абсорбционные методы, особенно селективная абсорбция, играли всегда большую роль в очистке ферментов. Современные методы колоночной хроматографии, электрофореза разного типа (зонный, на бумаге, в геле и др.), разделительной противоточной хроматографии и препаративного ультрацентрифугирования создали возможность получать почти любой фермент в чистом виде.

Большую роль в получении ферментов высокой чистоты сыграла кристаллизация. В настоящее время имеется более 100 кристаллических ферментов и это число постоянно увеличивается. Кристаллизация обычно бывает последним этапом очистки белка. Хотя она и не всегда дает совершенно однородные препараты многократная перекристаллизация обычно приводит к выделению ферментов с максимальной удельной активностью.

Относительно легко кристаллизуются ферменты типа альбуминов, при насыщении концентрированных растворов сернокислым аммонием. При этом необходимо обращать внимание на pH и изменения температуры. Глобулины кристаллизуют диализом между раствором и дистиллированной водой. Иногда удается вызвать кристаллизацию путем добавления гигроскопического средства, типа спирта или ацетона. Таким путем впервые были получены кристаллы уреазы.

Микрофотографии альдолазы из мышц кролика (Baranowski 1939) и фосфоглицеральдегиддегидрогеназы из человеческих мышц (Baranowski 1940) представлены из собственной коллекции кристаллических ферментов автора.

Критерии чистоты фермента определяют его гомо- или гетерогенность. Преимущественно для этих целей применяют физико-химические методы. Особенно рекомендуются седиментация в ультрацентрифуге и электрофорез при широком диапазоне pH, но не превышающем пределов стойкости фер-

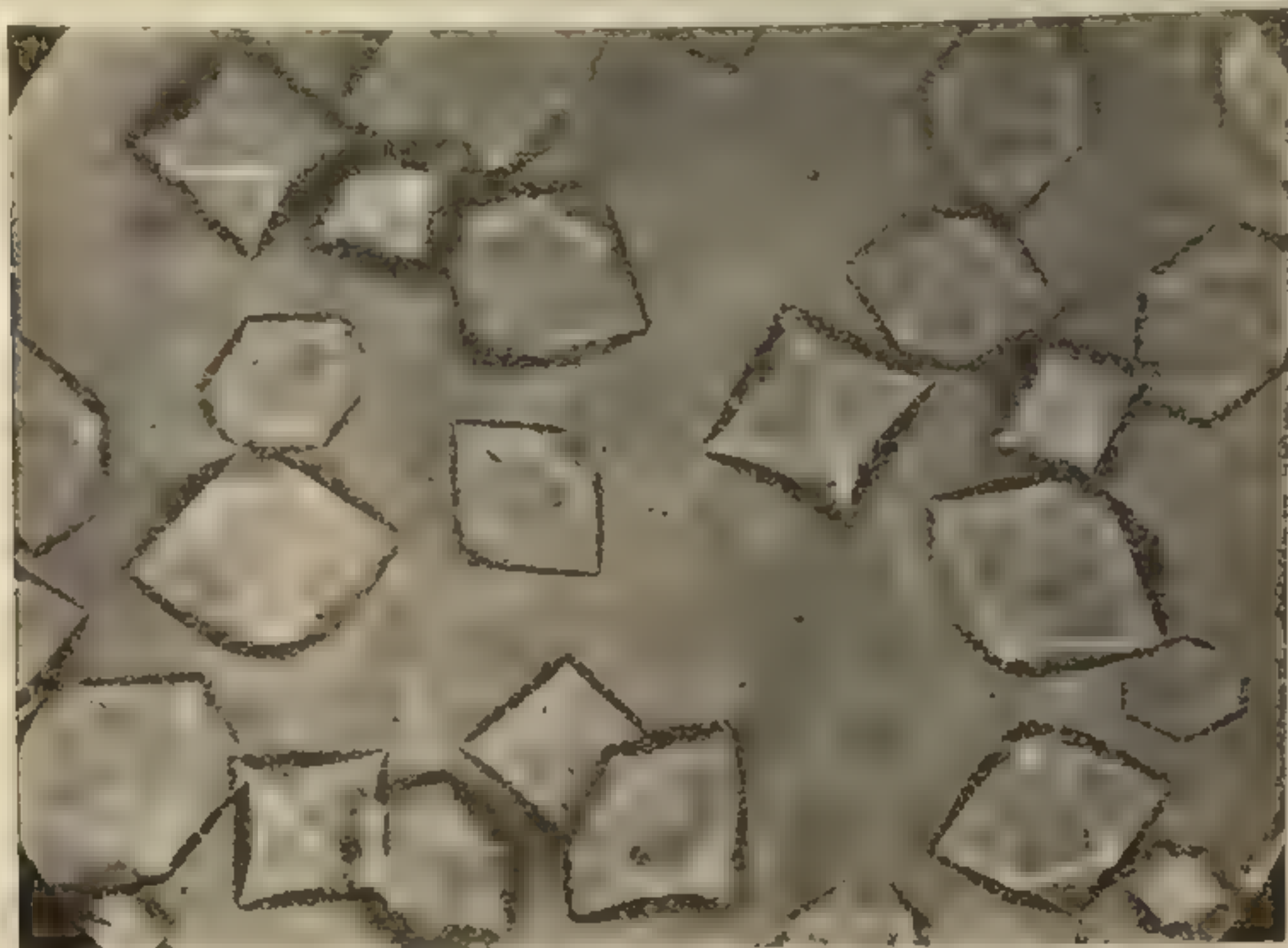


Рис. 6. Кристаллическая альдолаза из мышцы кролика. Увеличение в 160 раз (Baranowski).

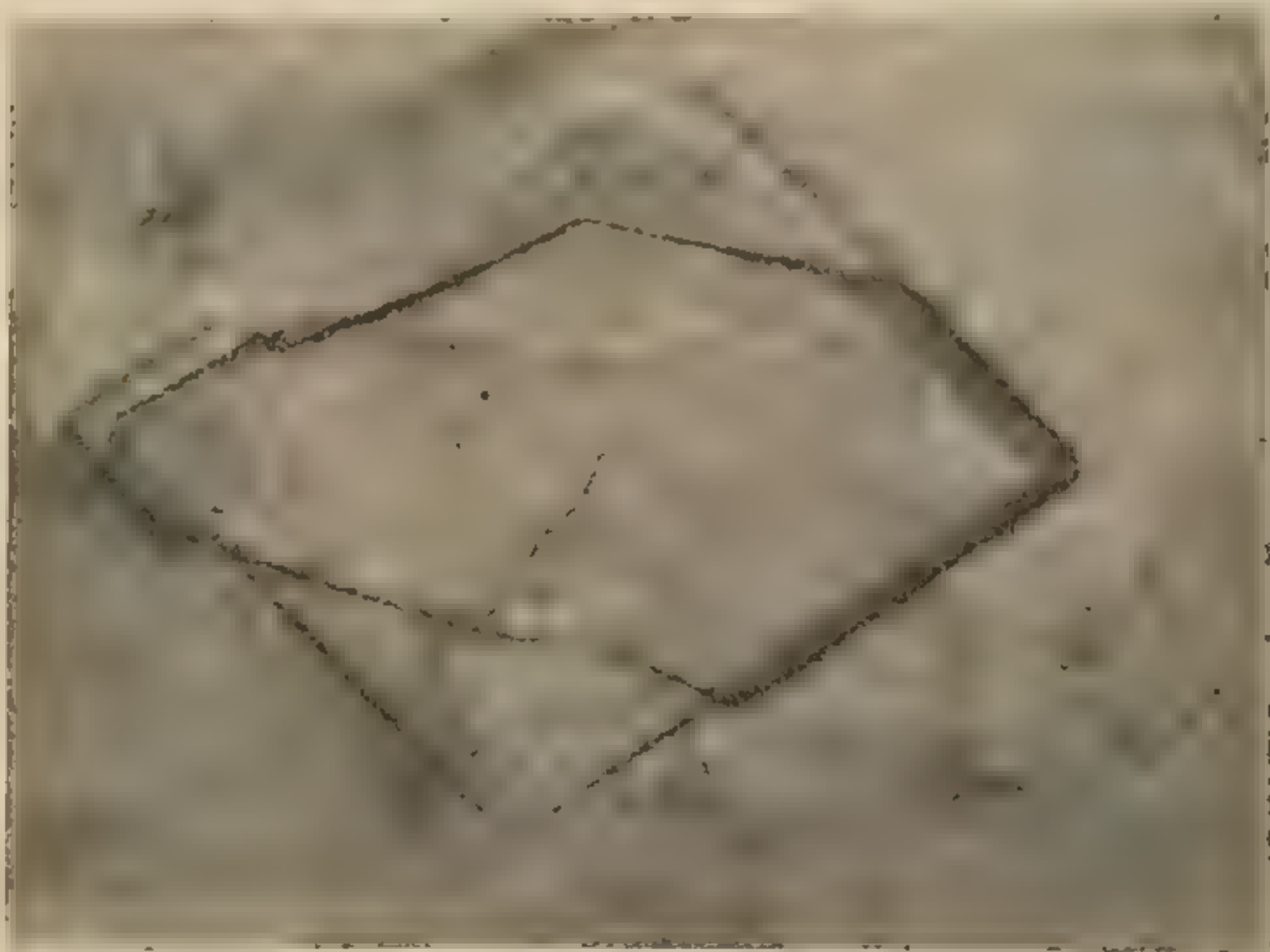


Рис. 7. Кристаллическая глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа из человеческой мышцы. Увеличение в 160 раз (Baranowski).

мента. Тест растворимости (60) обнаруживает загрязнения другими белками. Однако эти тесты не абсолютно надежны. Иногда они не позволяют обнаружить загрязнения не превышающие нескольких процентов.

Весьма обещающим тестом для проверки гомогенности ферментов является метод концевых групп (16). Однако, он применим только к тем ферментам, молекулы которых представляют собой одиночные пептидные цепи и обладают концевыми группами. Если хроматографический метод указывает на

характерную концевую группу фермента, то можно считать его гомогенным, а заодно и чистым.

На практике наиболее чувствительными методами нахождения загрязнений ферментов другими ферментами являются специфические ферментативные тесты. Например фосфоглицеральдегид-дегидрогеназа (даже кристаллическая), как правило, загрязнена альдолазой, триозофосфат-изомеразой и лактат-дегидрогеназой, а также следами других гликолитических ферментов. Об этом должны помнить все те, кто пользуется имеющимися в продаже кристаллическими препаратами ферментов, предполагая, что имеют дело с продуктом наивысшей чистоты. Получение препаратов ферментов в виде гомогенных растворов возможно лишь в исключительных случаях. Приготовление препаратов ферментов совершенно свободных от загрязнений другими ферментами затруднено. Поэтому, при пользовании находящимися в продаже препаратами кристаллических ферментов, необходимо проверять, не содержат ли они примесей таких ферментов, которые могли бы помешать проведению требуемой пробы.

Добавочным осложнением вопроса гомогенности ферментов являются многочисленные факты наличия одного и того же фермента в нескольких разновидностях, различных по физическим свойствам (последовательность элюирования на колонке, электрофоретическая подвижность) и чередованием аминокислот в пептидных цепях. Однако, удельная активность таких разновидностей, называемых изоферментами, одна и та же (16а).

Техника исследования фермента заключается в количественном контроле хода ферментативной реакции во времени. Функция фермента выражается в ходе катализируемой им реакции, и поэтому суть исследования ферментов состоит в определении скорости реакции. Эта скорость, обычно выражаемая убылью субстрата во время реакции, редко бывает пропорциональной времени, даже если другие условия остаются неизменными. Обычно скорость с течением времени уменьшается, что графически выражается например такой кривой:

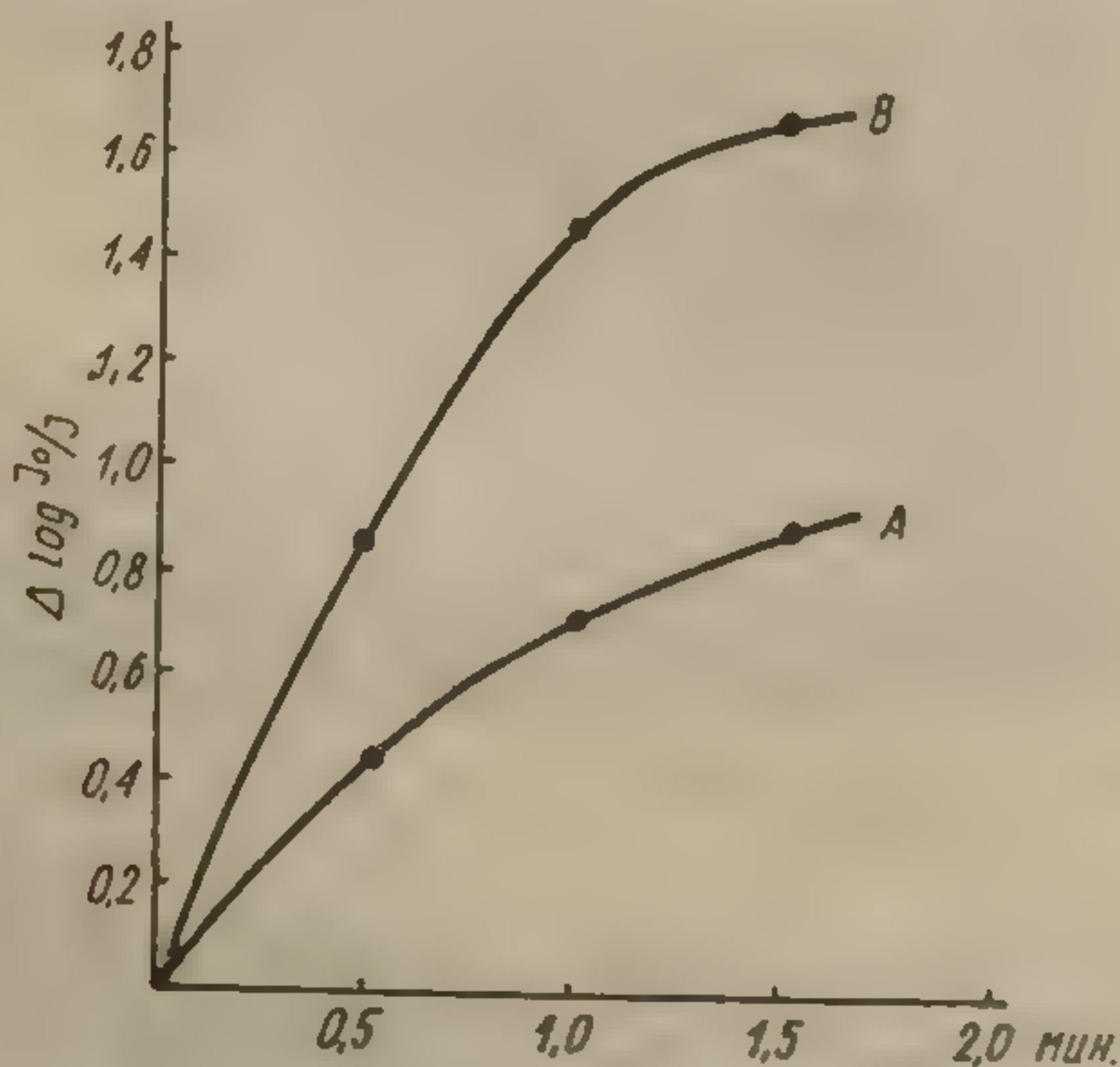


Рис. 8. Кривые начальной скорости окисления глицерол-3-фосфата посредством НАД, в присутствии специфической дегидрогеназы. $\Delta \log I_0/I$ — оптической плотности НАД · Н₂, определяемой спектрофотометрически при длине волны 340 мμ. В пробе В употреблено в два раза больше фермента, чем в пробе А (Baranowski, 1949).

Причиной замедления реакции может быть рост скорости реакции в обратном направлении, по мере накопления продукта реакции, или торможения фермента продуктом реакции; уменьшается насыщение фермента субстратом, или фермент начинает инактивироваться и т.п. Обычно такие кривые не соответствуют уравнениям скорости гомогенной реакции и не годятся для интерпретации.

Поэтому при исследовании активности ферментов пользуются измерением т.н. начальной скорости. Условия для ферментативной реакции известны лишь в исходной точке кривой реакции. Поэтому исследуется влияние изменений только одного параметра реакции во времени, при стабильности остальных факторов.

Для определения начальной скорости реакции проводят касательную к начальному отрезку экспериментальной кривой в точке соответствующей t_0 . На этом отрезке скорость реакции протекает линейно во времени, и только при этом условии количество убывающего субстрата может быть мерой скорости реакции. Всюду, где говорится о скорости ферментативной реакции, подразумевается начальная скорость реакции.

Основной величиной, характеризующей ферментативную активность, является удельная активность. Это количество субстрата, превращенного единицей массы фермента, в определенных для данной пробы условиях, т.е. при определенной температуре и pH, при насыщении фермента субстратом. Эта удельная активность может быть выражена в произвольных единицах. Это не единственный, но наиболее часто применяемый метод исследования ферментов. К сожалению, существуют разные единицы, даже для одних и тех же ферментов, в зависимости от условий, предлагаемых авторов исследования. Например, одни исследователи определяют активность фермента в молях субстрата убывающего из реакции за известный период времени при стандартных условиях. Другие измеряют активность того же фермента приростом продукта реакции если этот продукт легко определяется манометрически или спектрофотометрически. Иногда единицей активности считают время, необходимое для превращения определенного количества субстрата.

Иногда мерой удельной активности фермента считают коэффициент скорости реакции. Удельную активность определяют также т.н. „числом оборота“. Это число молекул субстрата, разложенных 1 молекулой фермента при заданной температуре в течении 1 минуты.

Большое количество разных единиц даже для одного и того же фермента затрудняет сравнение величин. Чтобы дать возможность сравнивать активность разных ферментов, был принят единый метод определения их удельной активности.

Единицы ферментов. Присутствие фермента обнаруживается на основании катализируемой им специфической реакции. В клинических исследованиях важно определение количества исследуемого фермента, т.е. его уровня в тканях и биологических жидкостях. В основном количество фермента определяют на основании измерения скорости катализируемой им химической реакции в соответствующих условиях опыта желательно таких, при которых реакция протекает с максимальной и пропорциональной концентрации фермента скоростью.

За исключением немногих, хорошо очищенных и охарактеризованных в химическом отношении ферментов, невозможно определить их количество в абсолютных единицах. Поэтому приходится выражать их активность в „ферментативных единицах“. Условно они относятся к скорости ферментативной реакции, т.е. к такому количеству фермента, которое обуславливает опреде-

ленную скорость реакции. Только при условии получения фермента в химически чистом виде можно сравнить условные единицы ферментов с абсолютным количеством фермента в исследуемой пробе. Тогда получается специфическая активность фермента (например в единицах на мг фермента) или молярная специфическая активность (например в единицах на микромоль), если была определена молекулярная масса фермента. В этих случаях можно на основании найденного при ферментативном тесте числа единиц вычислить абсолютное количество фермента в исследуемой пробе, даже, если он находится в ней в неочищенном виде.

Комиссия по ферментам Международного биохимического союза желая создать возможность сравнивать активность одних и тех же и разных ферментов между собой, ввела понятие абсолютной единицы ферментов (Е) и точно определила условия стандартного теста для ее вычисления.

Определение единицы: за единицу (Е) любого фермента, принимают такое его количество, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата (или одного микроэквивалента химической группы) в минуту, при заданных условиях. В числе этих условий должна находиться температура. Если это возможно температура должна равняться 25° . Ферментативная реакция должна протекать при полном насыщении фермента субстратом и при оптимальном рН.

При ферментном тесте особенно рекомендуется измерять начальную скорость реакции в таком периоде времени, в котором скорость остается неизменной, т.е. при реакции нулевого порядка. Если скорость реакции уменьшается в периоде времени, выбранном для исследования (например вследствие торможения ее продуктами реакции, то количество превращенного субстрата не будет пропорционально количеству фермента.

Для того, чтобы как можно более приблизить кинетику стандартного теста к нулевому ряду, следует полностью насыщать фермент субстратом s , т.е. употреблять достаточно высокие концентрации последнего. Если это условие невыполнимо (например из-за недостаточной растворимости субстрата) следует определить константу Михаэлиса K_m и пересчитать при ее помощи наблюдаемую скорость реакции на такую, которая соответствует полному насыщению фермента субстратом. Если при концентрации субстрата s скорость реакции выражается величиной v , то скорость при насыщении V равна:

$$V = v(1 + K_m/s)$$

Если величина s очень мала по отношению к K_m то $v = (V/K_m) s$. В таких случаях s обычно выражают активностью фермента в величинах константы скорости первого порядка k , поскольку $v = ks$, $V = kK_m$.

Единица, определение которой дано выше, представляет абсолютную величину. Она позволяет сопоставлять активность различных ферментов в единицах, килоединицах (кЕ), миллиединицах (мЕ) и т.д. Она применима в тестах, в основу которых положены химические изменения характеризующие скорость реакции. Если основой измерений являются физические изменения, необходимо определение коэффициентов, связывающих количественно физические изменения с химическими.

Удельную активность выражают в единицах фермента на 1 мг белка. Концентрацию фермента выражают в единицах на 1 мл.

Молекулярная активность соответствует числу единиц фермента на микромоль фермента при оптимальной концентрации субстрата. Она выражает число молекул субстрата, превращаемых в одну минуту молекулой фермента (или одним каталитическим центром). Это другое значение понятия, известного в прошлом под названием „число оборота“.

КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ КИНЕТИКИ

Реакция имеет место в случае, если происходит столкновение молекул. Поскольку частота столкновений пропорциональна числу молекул в данном объеме, т.е. концентрации веществ, скорость реакции пропорциональна концентрации реагентов (реагирующих тел).

Зависимость скорости реакции от концентрации реагентов определяется путем наблюдения хода реакции во времени, т.е. изменений концентрации субстратов и продуктов реакции с истечением времени. Результаты определения позволяют составить уравнение скорости реакции в виде кривой.

Самой простой является реакция нулевого порядка, т.е. такая реакция, скорость которой v остается неизменной с течением времени ($v = \text{constans}$). Такой ход реакции часто наблюдается в т.н. стационарном состоянии. Его графическое изображение имеет вид прямой, параллельной оси времени.

Реакцией 1 порядка называют реакцию, скорость которой пропорциональна концентрации только одного реагента (реагирующего вещества). Скорость такой реакции выражается следующим уравнением:

$$v = -dr/dt = k_1 r$$

в котором r — концентрация реагента и k_1 — константа скорости данной реакции. Знак — означает убыль субстрата реакции.

Если нет материального обмена между реагирующей системой и окружающей средой, реагирующую систему называют „закрытой“. В такой системе реакция может дойти до конца, а ее кинетика вычисляется путем интегрирования соответствующего дифференциального уравнения. Реакцией первого порядка является например распад радиоактивного элемента или термическая денатурация белков, что выражается общим химическим уравнением



Если символами s и p обозначить концентрации S (субстрата) и P (продукта) во время t , а s_0 — начальную концентрацию S , то

$$v = dp/dt = k_1(s_0 - p) \quad (1)$$

а после интегрирования

$$(s_0 - p) = s_0 e^{-k_1 t} \quad (2)$$

Концентрация S в любое время (т.е. $s_0 - p$) является показательной функцией времени. Она пропорциональна начальной концентрации субстрата.

Из двух предыдущих уравнений получается третье:

$$v = dp/dt = k_1 s_0 e^{-k_1 t} \quad (3)$$

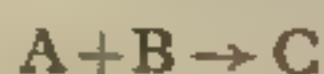
Следовательно, скорость реакции выражается терминами времени и начальной концентрации субстрата.

Если ход реакции выражается таким уравнением, она относится к кинетике первого порядка. Формально она может быть бимолекулярной реакцией — например гидролиз сахарозы



В реакции принимают участие молекулы воды, но они имеются в таком избытке (в разведенных растворах сахарозы), что с практической точки зрения убылью воды можно пренебрегать. Скорость реакции тогда соответствует уравнению (3), в котором величина s_0 означает начальную концентрацию сахарозы, а величина k_1 является константой, состоящей из собственно постоянной скорости реакции гидролиза, постоянной концентрации воды (равной 1) и концентрации катализатора.

Если в реакции участвует больше одного рода молекул, например



(а их начальные концентрации a_0 и b_0 удовлетворяют условию: $a_0 > b_0$), то кинетика реакции еще может быть определена относительно легко. Она может принять характер реакции II порядка (ее скорость пропорциональна концентрации обоих реагентов), а уравнение ее скорости:

$$v = dc/dt = k_2 ab = k_2(a_0 - c) \cdot (b_0 - c)$$

Величины a , b и c означают концентрации реагентов по истечении времени t . После интегрирования получается:

$$k_2 = \frac{1}{(a_0 - b_0)t} \ln \frac{b_0(a_0 - c)}{a_0(b_0 - c)}$$

Порядок реакции можно определить опытным путем, начиная с равных концентраций реагентов на основании общего уравнения:

$$k_n = \frac{(a_0 - x)^{1-n} - a_0^{1-n}}{(n-1)t}$$

где x означает уменьшение концентрации A по истечении времени t , а n означает порядок реакции.

При ферментативных реакциях для облегчения толкования экспериментальных данных часто постулируются реакции I порядка. В действительности порядок реакции часто изменяется в ходе процесса и может стать любой величиной от 2 до 0, не исключая дробей. Порядок реакции бывает непостоянным также для разных концентраций реагентов. Например, при термической инактивации пепсина этот порядок изменяется в зависимости от концентрации пепсина.

Все, что было сказано выше по вопросу кинетики, относилось к необратимым реакциям. Если такое упрощение неприемлемо для ферментативных реакций, и нельзя пренебречь скоростью реакции в обратном направлении по отношению к прямой реакции, математическая формулировка кинетики становится более сложной.

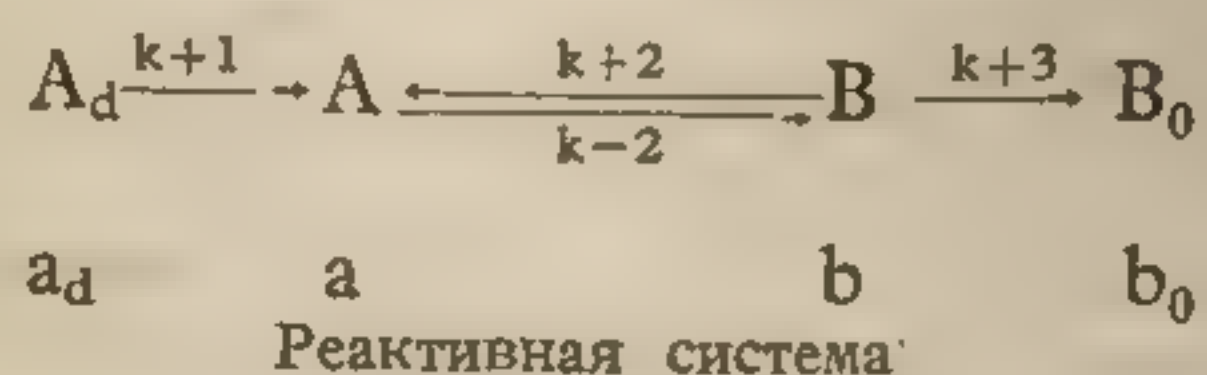
Описанные правила кинетики относятся к закрытым системам. Эта кинетика применима к ферментативным реакциям в пробирке. В отличие от этих реакций, кинетика „открытых систем“, т.е. таких, в которых происходит обмен веществ через границу ферментной системы, имеет основное значение для внутриклеточных реакций. При кинетическом анализе любого процесса, протекающего *in vivo*, мы вынуждены пользоваться кинетикой открытых систем.

Как в закрытой, так и в открытой системах исследуются кинетические состояния независимые от времени. В первом случае это состояние химического равновесия, во втором — стационарное состояние системы. Эти состояния различны по своим свойствам. Закрытая система не зависит от обмена составных частей с окружающей средой, и ее существование не зависит от притока энергии, хотя в ней и происходят химические реакции. В открытой системе, в стационарном состоянии имеют место непрерывный приток компонентов извне, их переработка и вывод из системы. Свободная энергия поступающих веществ частично рассеивается. Состав равновесной смеси в закрытой системе зависит от начальной концентрации реагентов, концентрации которых в стационарном состоянии не зависят от исходных величин.

Открытые реактивные системы в стационарном состоянии характеризует наличие этапов реакции, ограничивающих равнодействующую скорость. Вследствие этого, концентрации реагентов и постоянные скорости реакции для отдельных этапов так сбалансированы, что все реакции системы идут с одинаковой скоростью.

Живые организмы обладают свойствами открытых систем, весьма приближенных к стационарному состоянию. Стационарное состояние может быть нарушено притоком реагентов извне, однако, оно возвращается к исходной точке по прекращении притока. Такие реакции организма на преходящие стимулы наблюдаются часто и компенсируются его саморегулирующей способностью. Если стимул постоянен, то в открытой системе возникает новое стационарное состояние.

Примером открытой системы может служить биохимическая реакция, в которой величина A_d означает соединение, поступающее в систему, B_0 — соединение, уходящее из реактивной системы, величины A и B соединения в системе, а величины a и b — их концентрации:



Уравнения скорости реакции:

$$\begin{aligned} da/dt &= k_{+1}(a_d - a) + k_{-2}b - k_{+2}a \\ db/dt &= k_{+2}a - k_{-2}b - k_{+3}(b - b_0). \end{aligned}$$

В стационарном состоянии концентрации A и B т.е. a_s и b_s вычисляют, принимая, что равнодействующая скорости реакции будет равна 0 (т.е. $da/dt = db/dt$).

Следовательно

$$\begin{aligned} a_s &= \frac{k_{+1}k_{-2}a_d + k_{+1}k_{+3}a_d + k_{-2}k_{+3}b_0}{k_{+1}k_{-2} + k_{+1}k_{+3} + k_{-2}k_{+3}} \\ b_s &= \frac{k_{+1}k_{+2}a_d + k_{+1}k_{+3}b_0 + k_{+2}k_{+3}b_0}{k_{+1}k_{-2} + k_{+1}k_{+3} + k_{+2}k_{+3}} \end{aligned}$$

Если на описанную выше открытую систему подействует такой стимул, что повысится k_{+2} (например посредством воздействия активатора на фермент), то концентрация a понизится, а концентрация величины b возрастет. Скорость притока A пропорциональна $(a_d - a)$, следовательно величина a повысится, и дефицит величины a пополнится. Скорость оттока B из системы пропорциональна $(b - b_0)$, следовательно величина a повысится, а тем самым величина b достигнет прежнего уровня.

После устранения стимула k_{+2} примет первоначальную величину a компенсационный процесс пойдет в обратном направлении. Описанный процесс в биохимической системе напоминает гомеостатический механизм в организме.

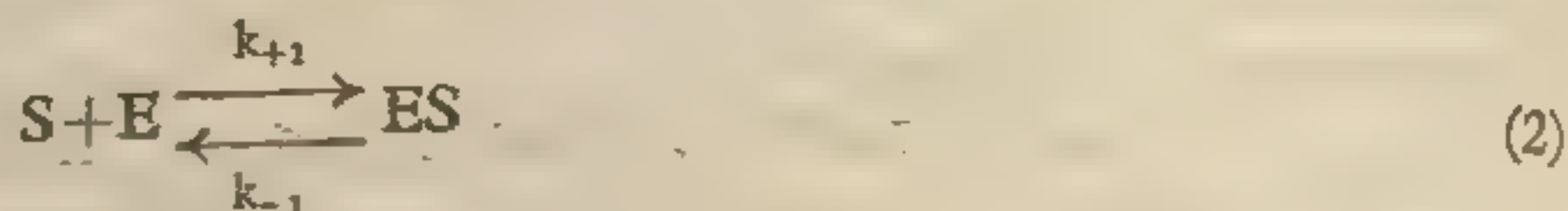
ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ СУБСТРАТА

Наибольшее практическое значение в кинетике ферментативной реакции имеет представление скорости реакции в качестве функции концентраций субстрата и фермента. Существует ряд уравнений, выражающих эту зависимость (11, 62, 63, 64). В основу их положен закон действия масс с некоторыми упрощениями.

Если дать ферментативной реакции в общей стехиометрической форме следующую формулировку:



то кинетический анализ этого процесса покажет, что он является системой состоящей по меньшей мере из двух реакций



где E означает фермент, S — первый субстрат, а ES — промежуточный комплекс. Первая из этих реакций (2) отражает возникновение гипотетического (по первоначальным положениям механизма реакции) комплекса фермент-субстрат (ES) и является реакцией второго порядка с константой скорости k_{+1} , а обратная реакция — распад или диссоциация комплекса ES, является реакцией первого порядка с коэффициентом пропорциональности или константой скорости k_{-1} . В следующей реакции (3) промежуточный комплекс соединяется с вторым субстратом, освобождая фермент и продукт (или продукты) реакции. Это реакция второго порядка с константой скорости k_{+2} .

Положение о существовании промежуточного комплекса, первоначально принятое в качестве рабочей гипотезы, помогло истолковать экспериментальные кривые скоростей реакций и подтвердилось в дальнейшем прямыми методами (изолирование комплекса). Это положение стало краеугольным камнем всех кинетических теорий созданных для ферментативных реакций.

В приведенной выше формулировке хода реакций следует произвести следующие упрощения. Во-первых фермент реагирует поочередно, а не одновременно с обоими субстратами, что тем более обоснованно, что вероятность тройного столкновения невелика. Во-вторых принимаем, что фермент имеет только один каталитический центр. В-третьих пренебрегаем реакцией обратной, по отношению к диссоциации промежуточного комплекса на фермент и продукт реакции, константой которой является k_{-2} . Это обосновано тем, что на практике кинетические исследования производятся при очень низкой концентрации P, для того чтобы можно было пренебречь $k_{-2} [P]$, т.е. в тот период когда обратная реакция еще не приобретает большой скорости.

Эти положения позволяют относительно просто формулировать зависимость скорости реакции от концентрации субстратов. Дифференциальные кинетические уравнения для реакций (2) и (3) принимают следующий вид:

$$\text{для убыли субстрата S: } -d[S]/dt = k_{+1}([E] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] \quad (4)$$

$$\text{для образования комплекса ES: } d[ES]/dt = k_{+1}([E] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES][Z] \quad (5)$$

$$\text{для убыли второго субстрата Z: } -d[Z]/dt = d[P]/dt = k_{+2}[Z][ES] \quad (6)$$

причем [E] означает концентрацию фермента (свободного плюс связанный), [ES] активную концентрацию комплекса, [S] и [Z] активные концентрации первого и второго субстрата. Аналитическое решение этих уравнений было бы связано с большими теоретическими и экспериментальными трудностями в первой, т.н. переходной кинетической фазе ферментативной реакции (продолжающейся обычно меньше секунды). Изучение этой фазы дало бы максимум сведений о механизме реакции. Зато относительно легко решить эти уравнения в условиях т.н. стационарного состояния, если ввести некоторые упрощения. Их описали в 1913 г. Michaelis и Menten (11).

Стационарное состояние (см. стр. 43) характеризуется постоянной концентрацией промежуточного комплекса. Тогда $d[ES]/dt = 0$, иначе говоря параметр времени в решениях перестает существовать, а суммарная реакция становится реакцией нулевого порядка. Если в стационарном состоянии $d[ES]/dt = 0$ то также

$$k_{+1}([E] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[Z][ES] = 0 \quad (7)$$

Это условие выполняется, если скорости реакций (4) и (6) равны. Следовательно, скорость образования продукта реакции

$$v = d[P]/dt = k_{+2}[Z][ES] \quad (8)$$

где [P] означает концентрацию продукта.

Для примера рассмотрим такую реакцию, в которой $[Z]$ постоянна (например вода в гидролитических реакциях, проводимых с ее избытком). Тогда выражение $k_{+2}[Z]$ как произведение двух констант может быть, заменен новой константой k'_{+2} , которая будет константой скорости реакции первого порядка:

$$k_{+2}[Z] = k'_{+2} \quad (9)$$

Если концентрация субстрата S растет, то реакция ускоряется вплоть до максимальной величины, т.е. до момента, когда весь фермент соединится с субстратом. Эта предельная величина максимальной скорости V тождественно равняется $k'_{+2}[E]$ то есть:

$$v = k'_{+2}[E] = V \quad (10)$$

Она достигается после „насыщения“ фермента субстратом.

Реакция проходит при больших концентрациях субстрата в виде реакции I порядка по отношению к ферменту и как реакция нулевого порядка по отношению к субстрату.

Как видно, при соблюдении этих условий на основании скорости реакции, выраженной убылью субстрата, можно определить концентрацию фермента, прямопропорциональную этой скорости. Такие исследования производятся при очень малой концентрации фермента по отношению к концентрации субстрата, так как только при этом условии можно пренебрегать концентрацией субстрата связанного с ферментом.

Подставляем уравнения (8), (9) и (10) в уравнение (7):

$$k_{+1}([E] - [ES])[S] - k_{-1}[ES] - k'_{+2}[E][ES] = 0$$

$$k_{+1}([E] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k'_{+2}[E][ES]$$

$$k_{+1}([E] - [ES])[S] = k_{-1}[ES] + k'_{+2}[ES]$$

$$([E] - [ES])[S] = \frac{(k_{-1} + k'_{+2})[ES]}{k_{+1}}$$

$$\left(\frac{[E]}{[ES]} - 1 \right) [S] = \frac{k_{-1} + k'_{+2}}{k_{+1}}$$

$$\text{Так как } [E] = \frac{V}{k'_{+2}}, \quad \text{а } [ES] = \frac{v}{k'_{+2}}$$

$$\text{то } \left(\frac{\frac{k'_{+2}}{V}}{\frac{v}{k'_{+2}}} - 1 \right) [S] = \frac{k_{-1} + k'_{+2}}{k_{+1}}$$

$$\text{или } \left(\frac{V}{v} - 1 \right) [S] = \frac{k_{-1} + k'_{+2}}{k_{+1}} \quad (11)$$

Если скорость реакции дающей продукт мала в сравнении со скоростью образования комплекса фермент-субстрат (т.е. $k_{+2} \ll k_{+1}$), то величиной k_{+2} можно пренебречь и уравнение упрощается следующим образом:

$$\left(\frac{V}{v} - 1 \right) [S] = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = K_s \quad (12)$$

Преобразовывая уравнение (12) получаем уравнение Michaelis и Menten:

$$v = \frac{V[S]}{K_s + [S]} = \frac{V}{1 + K_s/[S]} \quad (13)$$

Если подобрать столь малые концентрации субстрата, чтобы $[S] \ll K_s$ то, пренебрегая $[S]$ получаем:

$$v = \frac{V}{K_s} [S] \quad (14)$$

При этих условиях скорость реакции пропорциональна концентрации субстрата. Поэтому учитывая субстрат реакцию относят к I порядку. При очень больших концентрациях субстрата, когда $[S] \gg K_s$

$$v = V$$

скорость реакции не зависит от концентрации субстрата, то реакцию принадлежит с учетом роли субстрата относят к нулевому порядку.

Графическим изображением уравнения Michaelis и Menten является равнобедренная гипербола, что вытекает из преобразования уравнения (13)

$$(V-v)(K_s+[S]) = VK_s \quad (15)$$

имеющего ту же форму, что и уравнение

$$(a-v)(b+s) = \text{const.} \quad (\text{рис. 9})$$

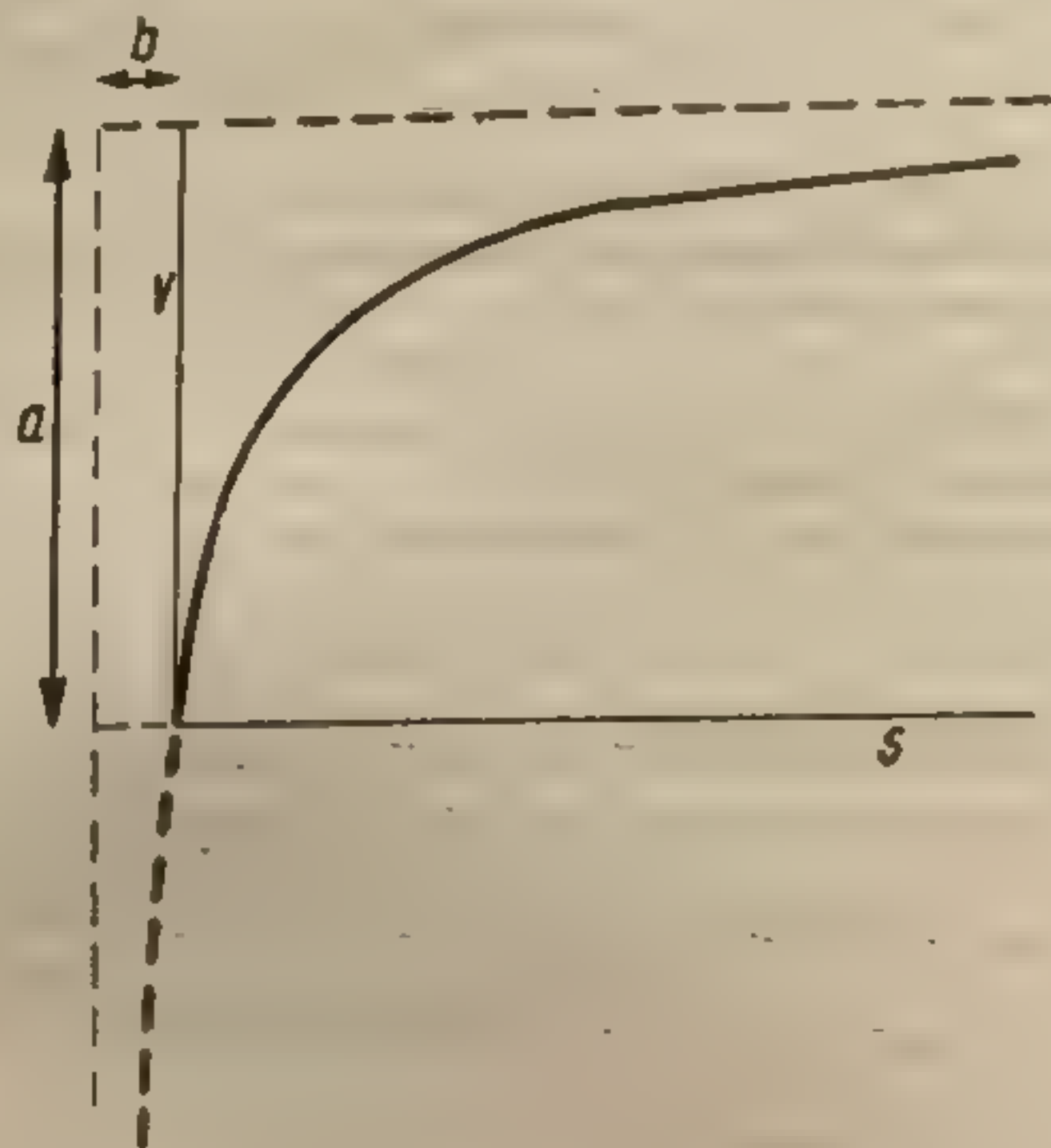


Рис. 9.

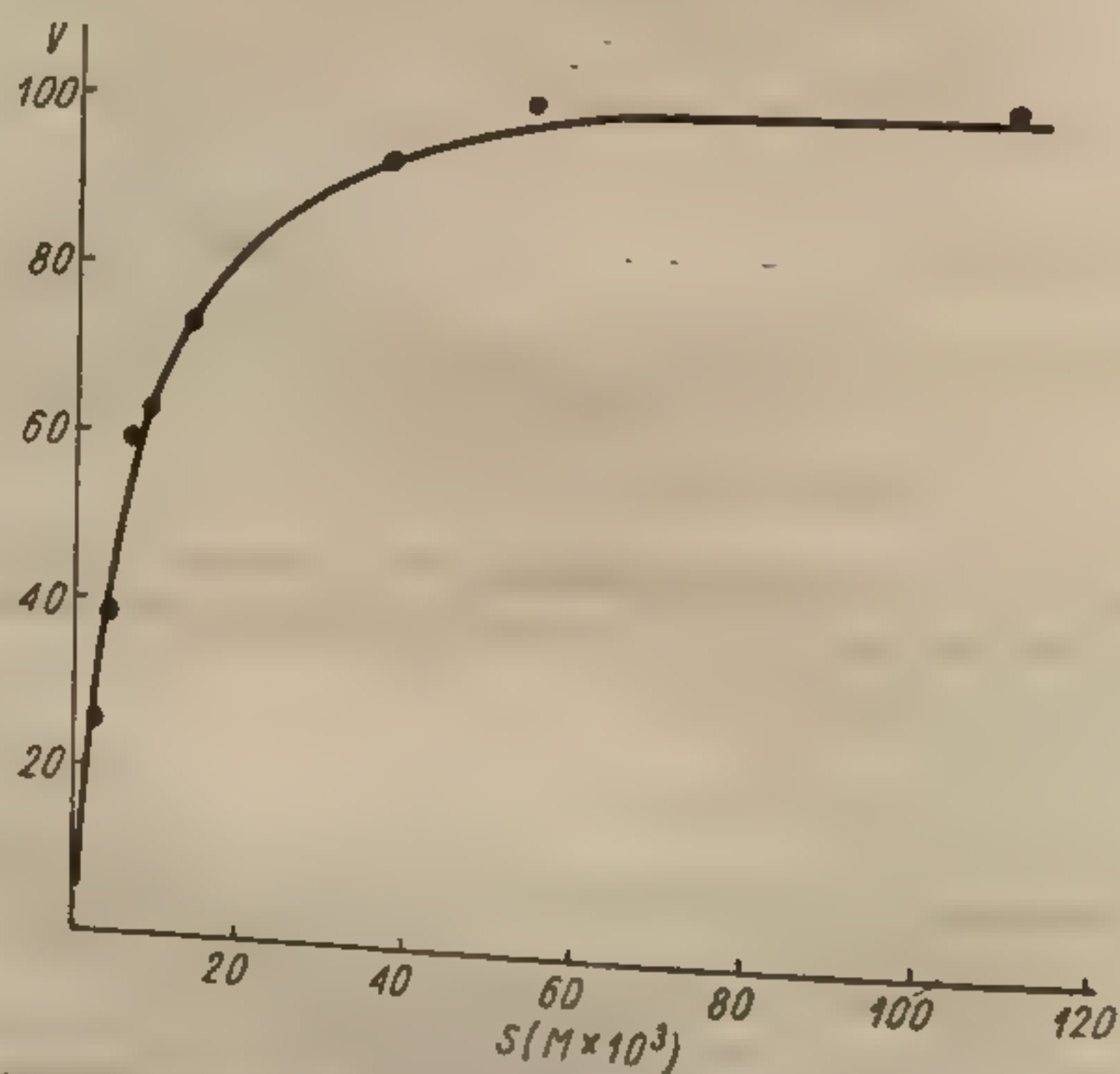


Рис. 10. Влияние концентрации субстрата (s) на начальную скорость (v) гидролиза лактозы (Mitchell, 1952).

Для сравнения приводится экспериментальная кривая гидролиза лактозы (рис. 10). Уравнение (14) применимо только к начальному отрезку кривой в котором ее наклон равен V/K_s . Уравнение $v = V$ относится к конечному отрезку кривой, когда можно определить асимптотическую величину V или максимальную скорость. Из этого следует, что величина K_s точно определима только в том случае, если скорость реакции измеряется в широком диапазоне концентраций субстрата.

В основе теории Michaelis и Menten лежит допущение, что равновесие между ферментом и субстратом достигается так быстро по сравнению с временем распада комплекса фермент-субстрат (т.е. $k_{-2} \ll k_{+1}$), что этот комплекс всегда остается в равновесии с ферментом и суб-

стратом. Доказательством того, что то-же самое происходит в большинстве биохимических реакций, является сходство экспериментальных кривых зависимости v от концентрации субстрата с графическим изображением уравнения Michaelis и Menten. Однако, для некоторых ферментов это условие невыполнимо и концентрация комплекса для них отличается от равновесной величины. Такие случаи были теоретически изучены Briggs и Haldane (62). Они получили то-же уравнение, что и Michaelis и Menten, с той только разницей, что K_s было заменено K_m являющимся не константой диссоциации, а константой стационарного состояния:

$$v = \frac{V}{1 + K_m/S} \quad (16)$$

K_m определяется выражением, содержащим константу скорости образования продукта:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k'_{+2}}{k_{-1}} \quad (17)$$

Взаимоотношение констант K_m и K_s определяется уравнением:

$$K_m = K_s + \frac{k'_{+2}}{k_{-1}} \quad (18)$$

K_s должно всегда быть меньше K_m и только при определенных условиях ($k_{+1} \gg k_{+2}$) может значительно приблизиться к этой величине. K_s является константой равновесия и обладает термодинамическим значением, зато K_m не является константой равновесия, так как содержит также кинетический элемент.

Если в уравнении (13) заменить v $1/2 V$ то $K_s = [S]$. Это такая концентрация субстрата, при которой скорость реакции численно равняется половине максимальной скорости. Есть договоренность, согласно которой константой Михаэлиса K_m называют такую концентрацию, при которой скорость равняется половине максимальной скорости.

K_m определяют при помощи кривой уравнения (16). Подставляют $v = V/2$ (рис. 11). На оси концентраций субстрата откладывают K_m .

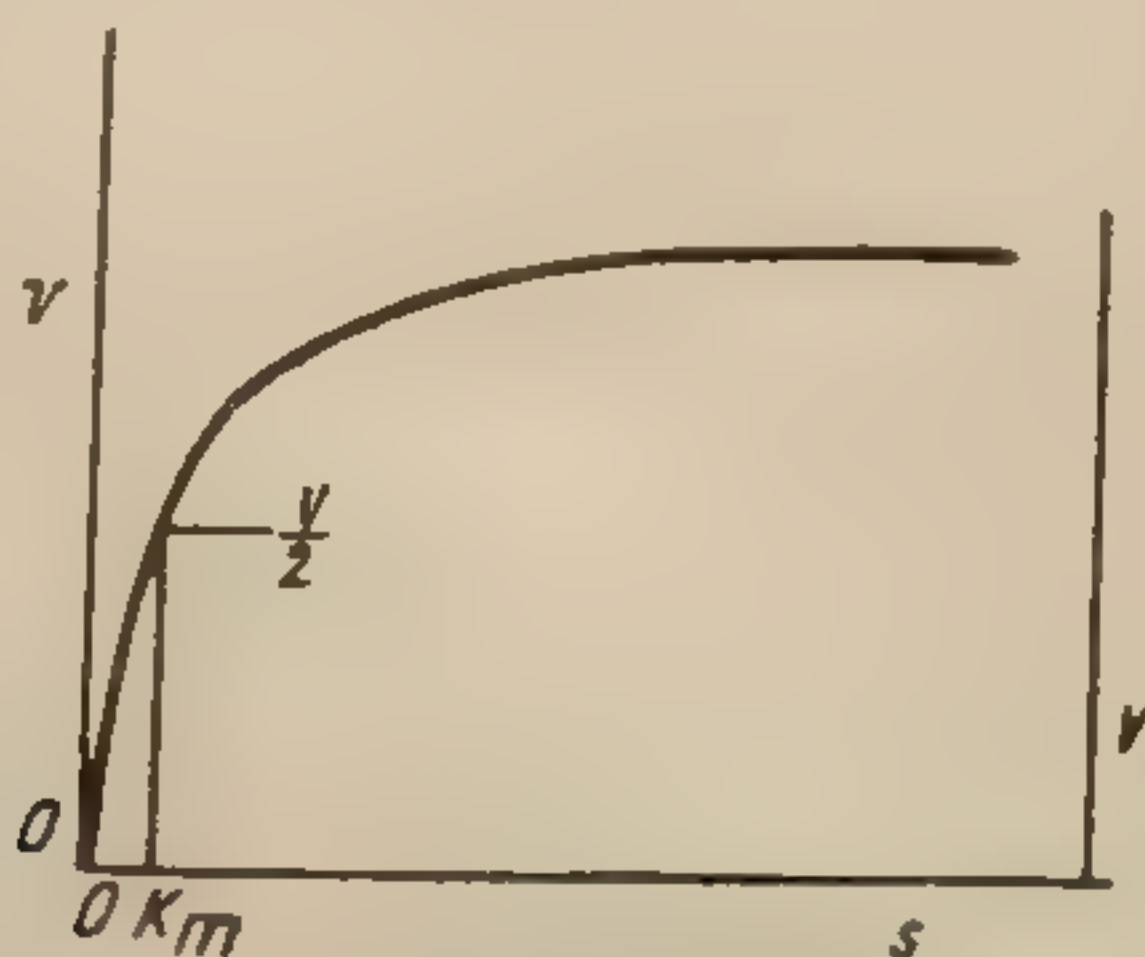


Рис. 11.

K_s определяется несколькими графическими методами (65, 66, 67). Чаще всего пользуются методом Lineweaver и Burk (66) с графиком обратной величины уравнения (13):

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{[S]} \frac{K_s}{V} + \frac{1}{V} \quad (19)$$

Если на оси ординат откладывать величины $1/v$, а на абсциссе $1/[S]$ то получается прямая, пересекающая абсциссу в точке $-\frac{1}{K_s}$ и ординату — в точке $\frac{1}{V}$. Наклон линии равен $-\frac{K_s}{V}$ (рис. 12а). Умножая уравнения (19) на $[S]$ получаем:

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_s}{V} + \frac{1}{V} [S] \quad (20)$$

Кривая $[S]/v$ по отношению к $[S]$ дает наклонение прямой — $1/V$ а ее пересечения с координатами — K_s и K_s/V (рис. 12b).

Для иллюстрации значения кинетических измерений дается несколько примеров. Производилось определение величины K_s для большого количества субстратов на нескольких группах ферментов небольшой специфичности. Опыты показали, что даже небольшие изменения в строении и форме субстрата оказывают значительное влияние на величину K_s . Это указывает на очень сильное сближение молекул фермента и субстрата. Кинетические данные также говорят за то, что фермент и субстрат воздействуют друг на друга в нескольких точках и что в катализе принимают участие определенная часть фермента (т.н. „каталитический центр“).

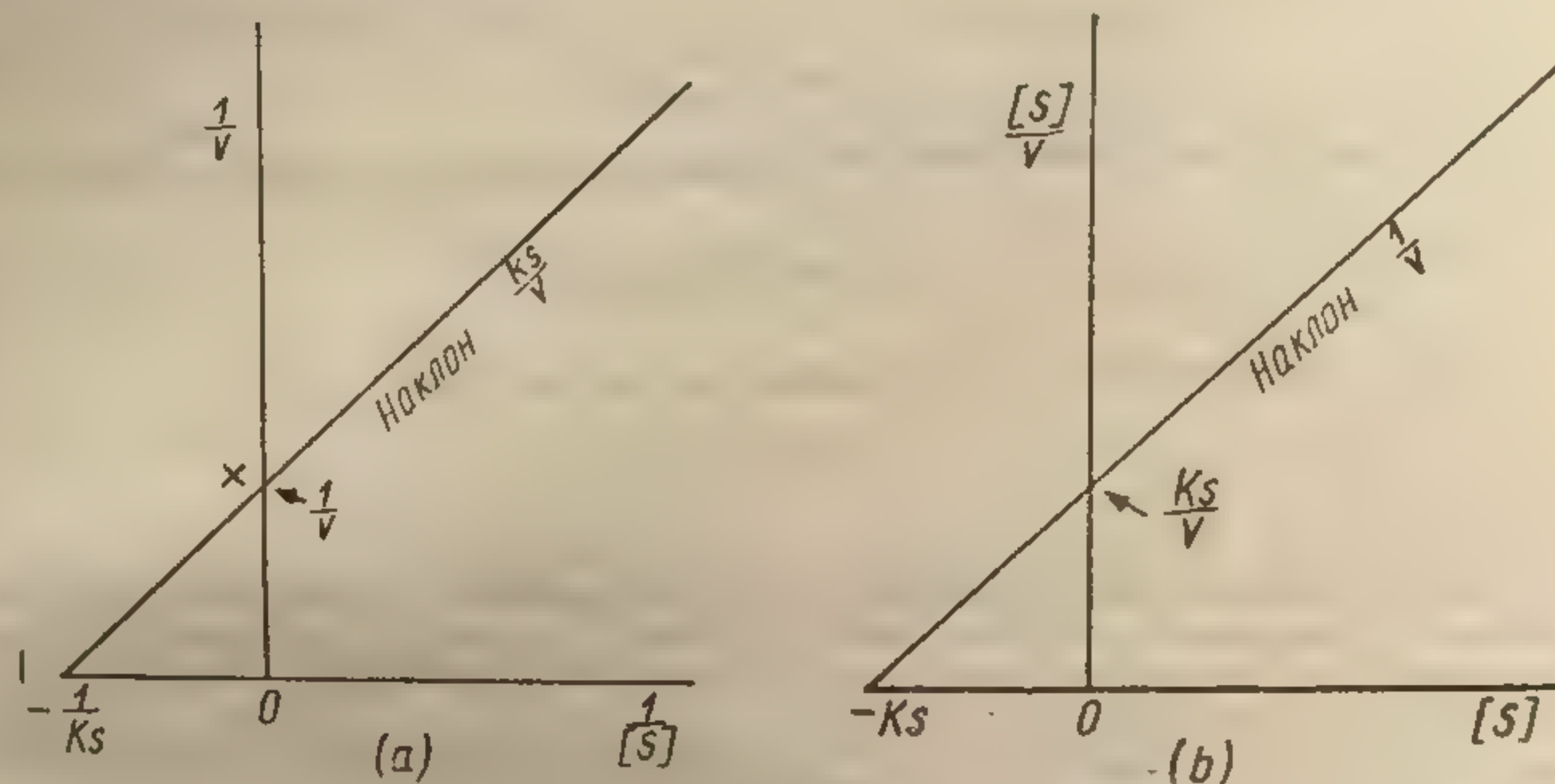


Рис. 12.

Из кинетических исследований можно также делать выводы относительно характера сил, связывающих фермент и субстрат. Так K_s принимает конечное значение только для положительно заряженных молекул субстрата, например, для трипсина. Можно предположить, что в данном случае связывание субстрата происходит при участии электростатических сил, аналогично солевым связям в белках.

У ацетилхолинэстеразы K_s уменьшается по мере удлинения углеводородной цепи в ацилоэфирах холина, употребляемых в качестве субстратов для этого фермента. Это явление указывает на участие сил ван дер Ваальса в связывании субстрата.

Была детально исследована кинетика реакций катализируемых гематиновыми ферментами, каталазой и пероксидазой. Благодаря интенсивным абсорбционным полосам этих ферментов и обособленности спектра промежуточного комплекса было возможно исследовать кинетику переходного состояния, пользуясь техникой скоростной спектрофотометрической регистрации (68). Кривая концентрации комплекса фермент-субстрат зарегистрированная в первую секунду изображена на рис. 13. От 0 до а наблюдается переходная фаза, которую характеризует быстрый рост комплекса. От а до b — стационарная фаза, отличающаяся почти неизменной концентрацией комплекса. Применяя кинетическое уравнение для стационарного состояния реакции, т.е. уравнение (4) и (6), получаем:

$$-d[S]/dt = -d[Z]/dt = k_{+2}[Z][E] \quad (21)$$

Можно изменять величину $[ES]$ изменяя концентрацию фермента $[E]$. Лучше изменять концентрацию субстратов, т.е. $[S]$ или $[Z]$. Зависимость между $[S]$, $[Z]$ и $[ES]$ согласно уравнению (7) имеет следующую форму:

$$[ES] = \frac{[E]}{1 + k_{-1} + k_{+2}[Z]/k_{+1}[S]} = \frac{[E]}{1 + K_m/[S]} \quad (22)$$

Подобным же образом можно изменять $[ES]$ прибавлением специфических ингибиторов. Если изменения $[ES]$ в широком диапазоне концентраций субстратов соответствуют уравнениям (21) и (22), то можно предположить, что наблюдаемое промежуточное соединение в реакции, активируемой каталазой, представляет собою активный комплекс фермент-субстрат.

Намного больше сведений дают кинетические исследования переходной фазы. Весьма эффективный метод нахождения активных промежуточных соединений в реакции и определения соответствующих данных состоит в прямом решении дифференциальных уравнений (4), (5) и (6) для $[ES]$, $[Z]$, $[S]$ и t (дифференциальный анализатор), в результате чего получается теоретическая кривая реакции, сравнимая с экспериментальными кривыми.

Исследования кинетики дали детальную информацию о ходе каталазной реакции. Перекись водорода и фермент реагируют, образуя зеленое соединение (первичное). Для каталазы оно является активным комплексом, дающим в дальнейшем продукты реакции. При большой концентрации H_2O_2 из зеленого соединения образуется красное (вторичное). У каталазы оно неактивно, но у пероксидазы является промежуточным соединением.

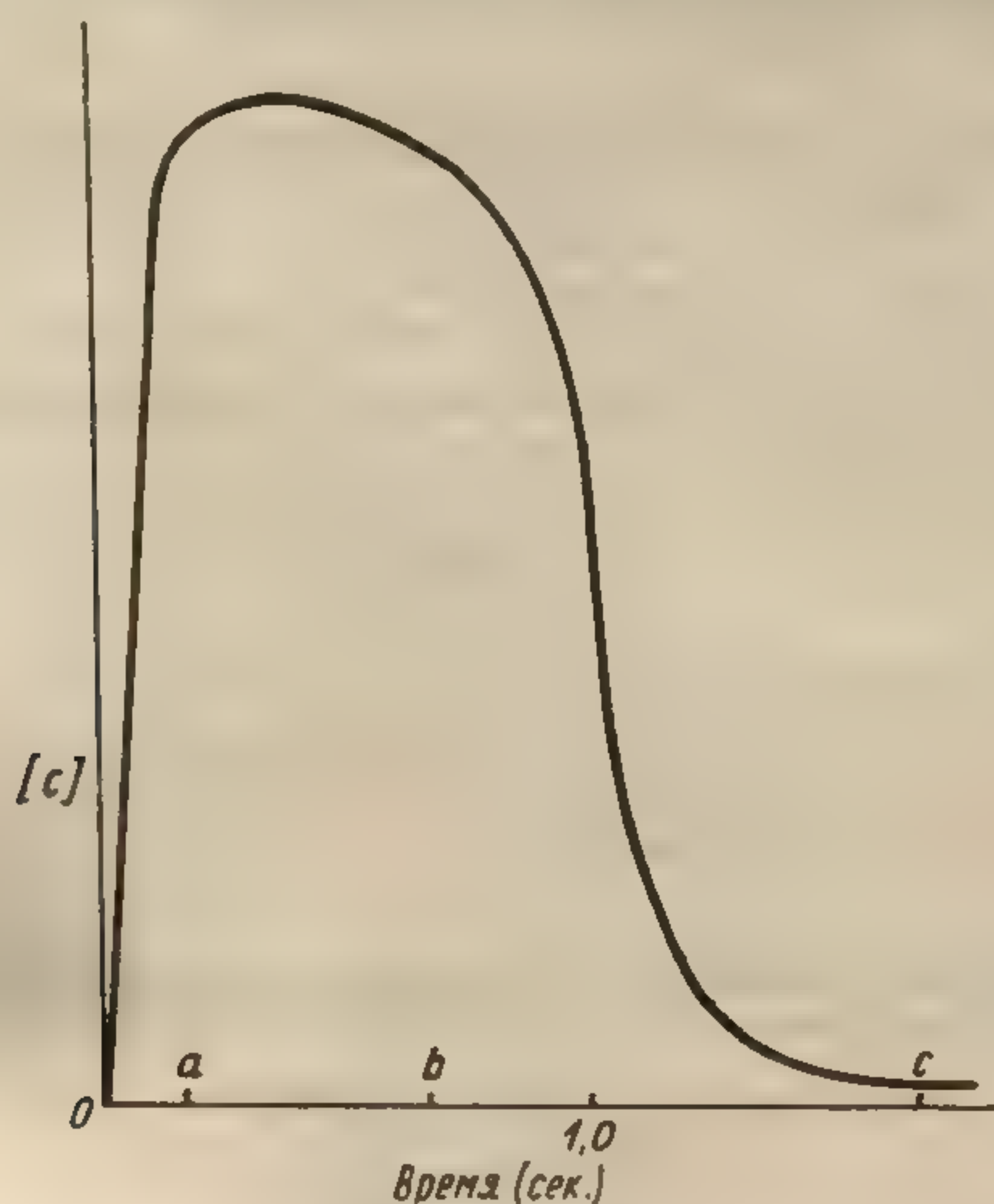


Рис. 13. Графическое изображение трех фаз реакционной кинетики комплекса каталаза- H_2O_2 (Chance, 1952).

Величина K_a активных комплексов необычайно мала — порядка констант диссоциации СО-гемоглобина. Скорости возникновения и распада активных комплексов фермент-субстрат весьма велики, константы скорости для реакций второго порядка составляет около $10^7 \text{ сек}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.

Определение константы диссоциации комплекса фермент-субстрат при различных температурах позволяет вычислить стандартную энтальпию и энтропию реакций образования этого комплекса. Можно также вычислить энергию активации обусловленную связыванием фермента и субстрата. Для каталазы и пероксидазы она очень мала и составляет около 1,4 ккал/моль. Это указывает, на высокую эффективность столкновений реагирующих молекул.

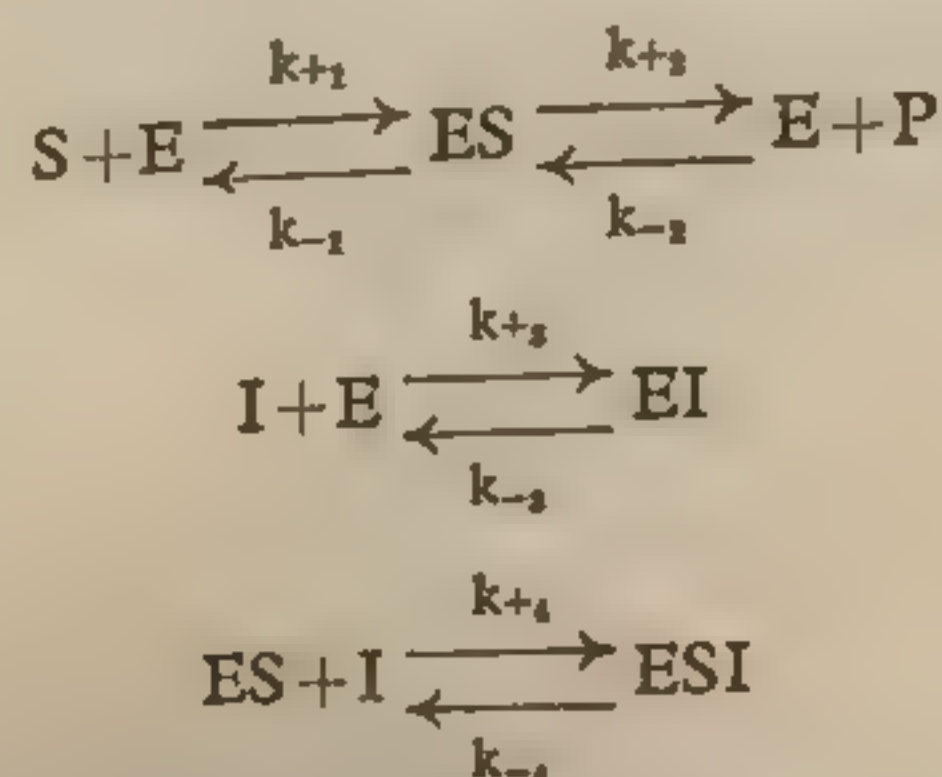
ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Скорость ферментативной реакции зависит от рода и концентрации реагирующих веществ. Знание зависимости этой скорости от присутствия других соединений, помимо фермента и субстрата, нередко имеет большое практическое и теоретическое значение.

Влияние разных соединений на скорость ферментативной реакции бывает обратимым или необратимым. Некоторые соединения вступают в специфические и необратимые реакции, тормозящие ферментативную активность, и их исследование может пролить свет на механизм ферментативных процессов. Примером является диизопропилфторфосфат, необратимо тормозящий ряд гидролаз. Изучение обратимых перемен также выясняет механизм реакций.

Уравнение скорости ферментативной реакции, проходящей в присутствии ингибитора получается путем включения в уравнение нетормозимой реакции выражения в общей форме $\left(1 + \frac{[I]}{K_i} + \dots\right)$, в котором $[I]$ представляет концентрацию ингибитора, а K_i константу диссоциации комплекса фермент-ингибитор.

Стехиометрический ход реакции тормозимой ингибитором представляют следующим образом



причем ES означает комплекс фермент-субстрат, EI — комплекс фермент-ингибитор, а ESI комплекс фермента с субстратом и ингибитором.

Принимая, что образование продукта реакции P является практически необратимой реакцией ($k_{+2} \gg k_{-2}$), можно пренебречь константой скорости реакции обратного направления, k_{-2} . Скорость тормозимой реакции будет

$$v = k_{+2}[ES]$$

так как она определяется скоростью распада комплекса фермент-субстрат.

Уравнения равновесия отдельных этапов реакции:

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = \frac{[S][E]}{[ES]} \quad (23)$$

$$K_i = \frac{k_{-3}}{k_{+3}} = \frac{[I][E]}{[EI]} \quad (24)$$

$$K_{si} = \frac{k_{-4}}{k_{+4}} = \frac{[I][ES]}{[ESI]} \quad (25)$$

где выражения в скобках являются концентрациями, а K_i ингибиторной константой. Выражение $[E_c]:[ES]$ определяет соотношение максимальной скорости реакции и скорости заторможенной реакции:

$$\frac{[E_c]}{[ES]} = \frac{V}{v} \quad (26)$$

Общая концентрация фермента $[E_c]$ равняется сумме свободного и связанного фермента:

$$[E_c] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI] \quad (27)$$

Решение реакции (23—27) для $\frac{V}{v}$ дает:

$$\frac{V}{v} = \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + \left(1 + \frac{[I]}{K_{si}}\right) \quad (28)$$

Это ответ для комплекса с одной молекулой ингибитора. Если K_{si} очень велика, т.е. если комплекс SI образуется в ничтожном количестве, уравнение (28) упрощается:

$$\frac{V}{v} = \frac{K_m}{[S]} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + 1 \quad (29)$$

Это означает, что фермент соединяется только с ингибитором или только с субстратом. Такое торможение называется конкурентным (а).

Допускается, что ингибитор связывается с тем же активным центром фермента, с которым соединяется и субстрат.

Имеется ряд примеров торможений конкурентного типа: торможение сукцинатдегидрогеназы малонатом или ацетилхолинэстеразы простигмином.

Если выражение $K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ принять за новую константу K_p , то уравнение (29) принимает следующую форму:

$$v = \frac{V}{1 + \frac{K_p}{[S]}} \quad (30)$$

тождественную с уравнением Michaelis и Menten. Влияние конкурентного ингибитора выражается увеличением псевдоконстанты Михаэлиса на фактор $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot V$ в присутствии избытка субстрата остается неизменным для тормозимой и нетормозимой реакций.

Если K_i равняется K_{si} , т.е. ингибитор имеет одинаковое сродство с ферментом и с комплексом фермент-субстрат, то:

$$\frac{V}{v} = \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \quad (31)$$

или

$$v = \frac{V}{\left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (32)$$

Такой тип торможения называется неконкурентным (б). Пример: торможение фосфофруктат-гидратазы (енолазы) фтористым ионом.

Если принять, что

$$V_p = \frac{V}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

уравнение (32) принимает форму:

$$v = \frac{V_p}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \quad (33)$$

и становится тождественным с уравнением Michaelis и Menten, в котором величина V_p заменяет величину V . Последствием неконкурентного торможения является изменение максимальной скорости V при неизменной константе Михаэлиса.

Влияние ингибиторов обоих типов (а и б) на графическое выражение уравнения Михаэлиса иллюстрируют рис. 14 и 15. Стрелка указывает направление сдвига кривой в присутствии ингибитора.

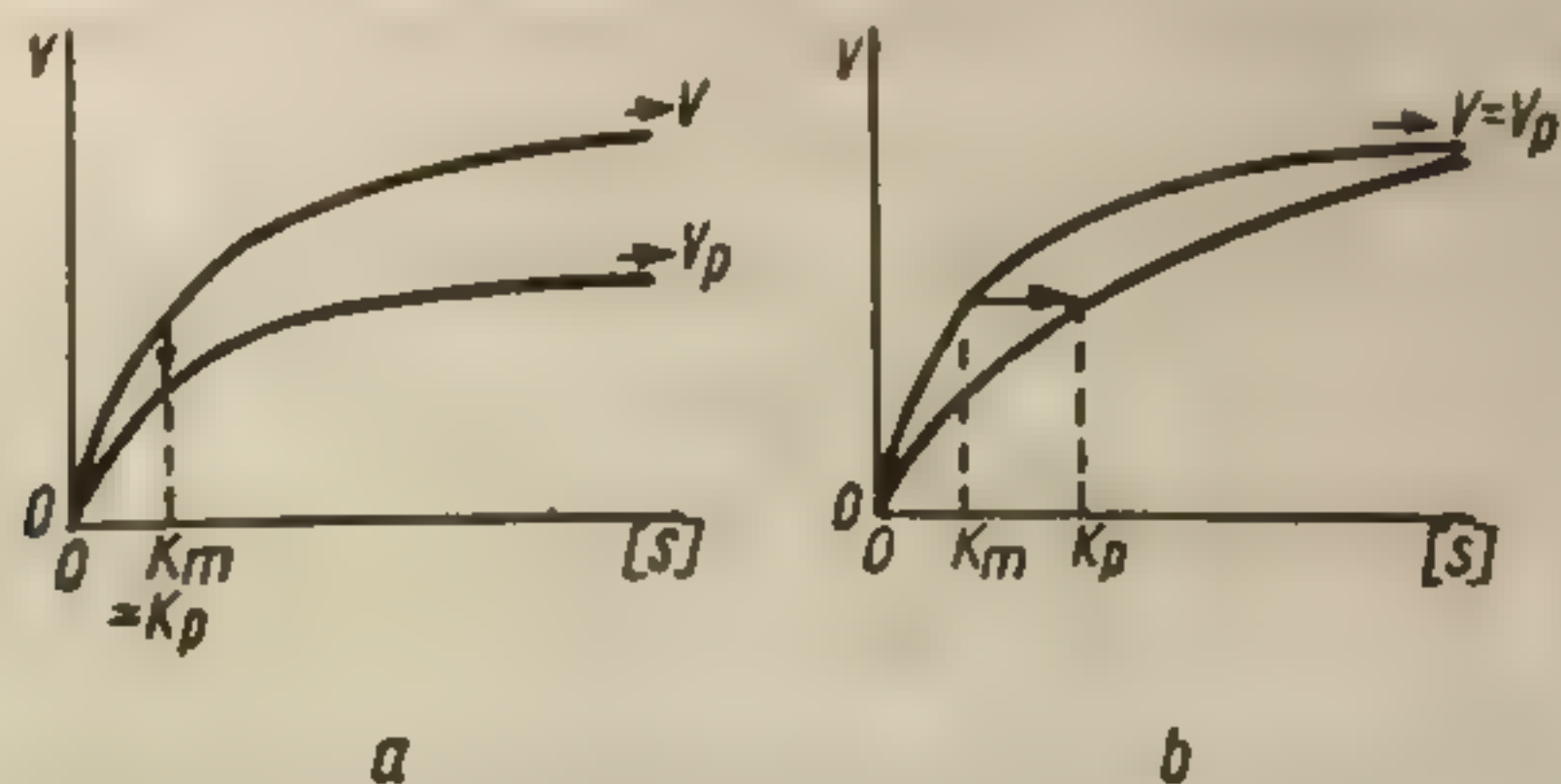


Рис. 14. Влияние ингибитора (а) конкурентного и (б) неконкурентного на скорость ферментативной реакции.

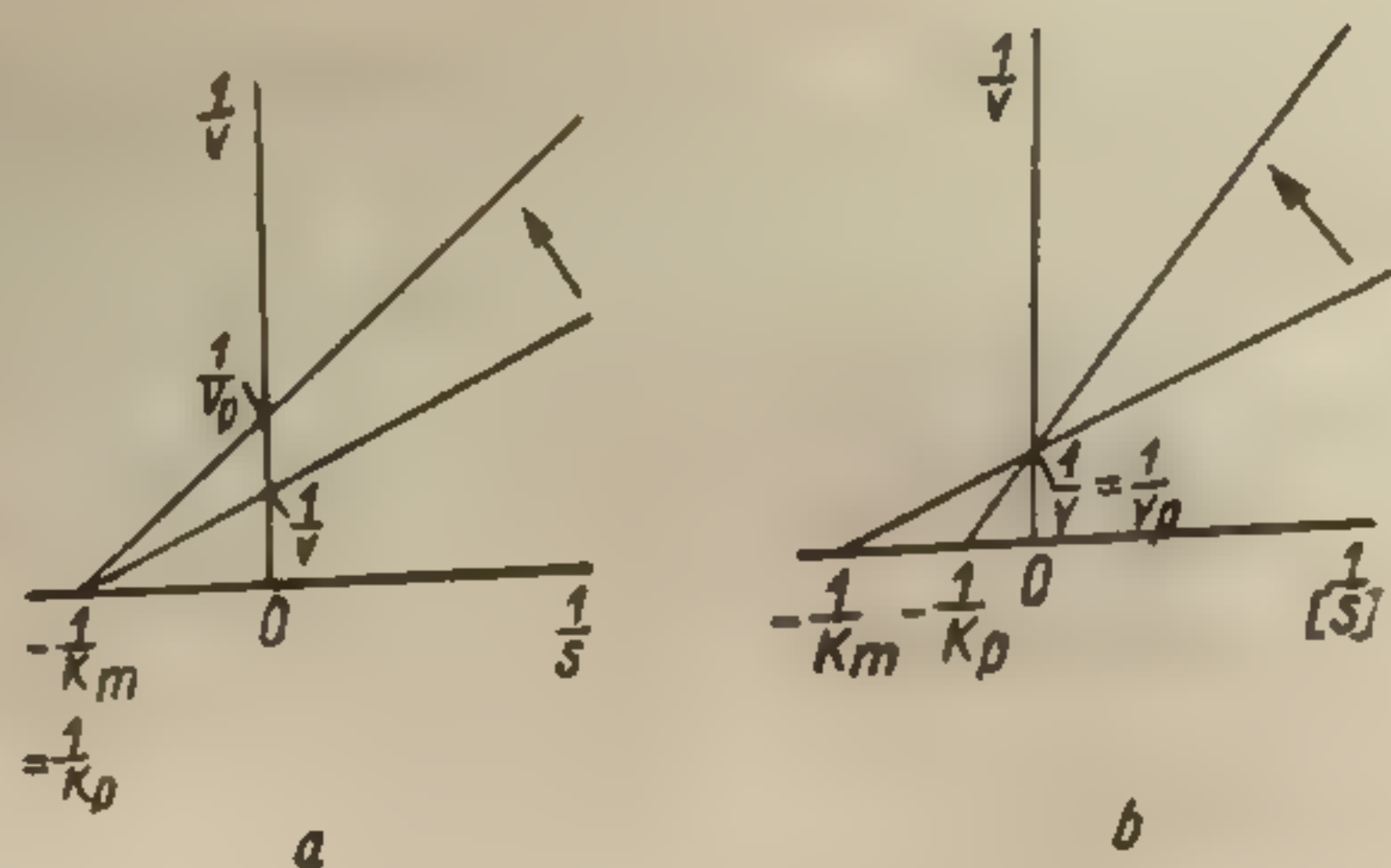


Рис. 15. Влияние ингибитора (а) конкурентного и (б) неконкурентного на кривую Lineweaver-Burk.

Определение K_i при обоих типах торможения состоит в определении начальных скоростей реакции с различными концентрациями субстрата. Лучше всего пользоваться графическим методом Dixon (69).

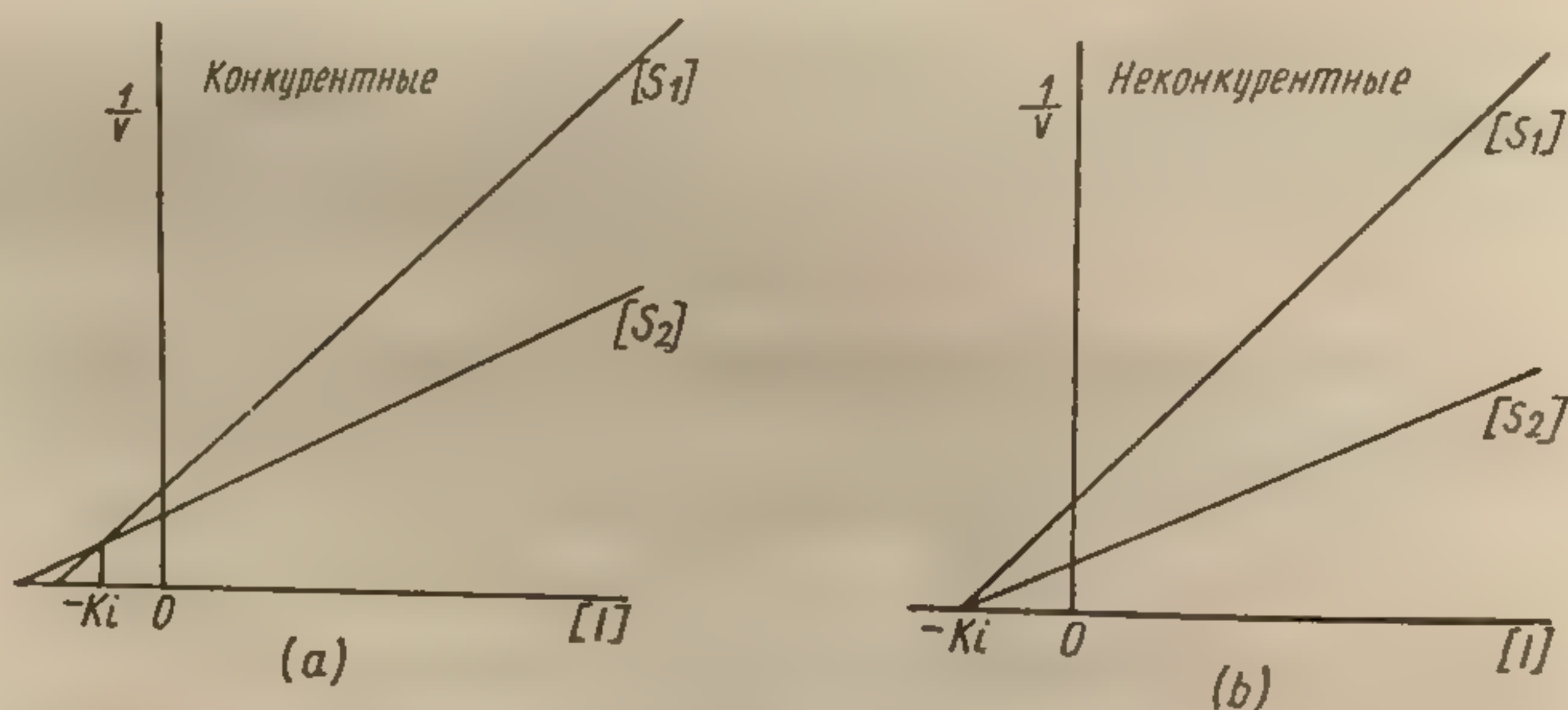


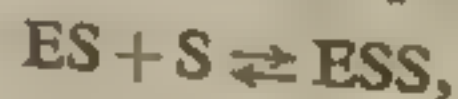
Рис. 16. Определение ингибиторной константы (K_i) по методу Dixon. S_1 и S_2 означают две разные концентрации субстратов.

Третий тип торможения также называется неконкурентным, ингибитор при этом соединяется не с ферментом, а с комплексом фермент-субстрат. В этом случае $K_i = \infty$ и уравнение (28) упрощается:

$$\frac{V}{v} = \frac{K}{[S]} + \left(1 + \frac{[I]}{K_{si}}\right) \quad (34)$$

Этот тип торможения наблюдается при действии азида на цитохромоксидазу. Ингибитор соединяется с окисленной формой фермента и не реагирует с восстановленной (свободный фермент).

Еще один пример торможения заслуживает внимания, а именно торможение избытком субстрата. Принимая, что вторая молекула субстрата может при этом соединяться с комплексом фермент-субстрат образуя неактивный, третичный комплекс



получаем уравнение скорости реакции:

$$V = \frac{K_m}{[E]} + \left(1 + \frac{[S]}{K_{ss}}\right) \quad (35)$$

Оно тождественно с уравнением неконкурентного торможения (34). Примером торможения ферментативной реакции субстратом является гидролиз ацетилхолина ацетилхолинэстеразой или гидролиз этил-L-миндальной кислоты липазой овечьей печени.

ВЛИЯНИЕ pH НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Активность ферментов зависит от pH. Скорость реакции, катализируемой ферментом, обычно достигает максимума при определенной величине pH и резко снижается при больших и меньших величинах. Графическое изображение зависимости скорости реакции от величины pH показывает более или менее крутой „оптимум“ pH. Это весьма важная величина, так как ферментативные тесты обычно проводятся при этом pH.

Исследование зависимости активности фермента от pH невозможно при предельных величинах pH, так как при этом происходит необратимая дена-

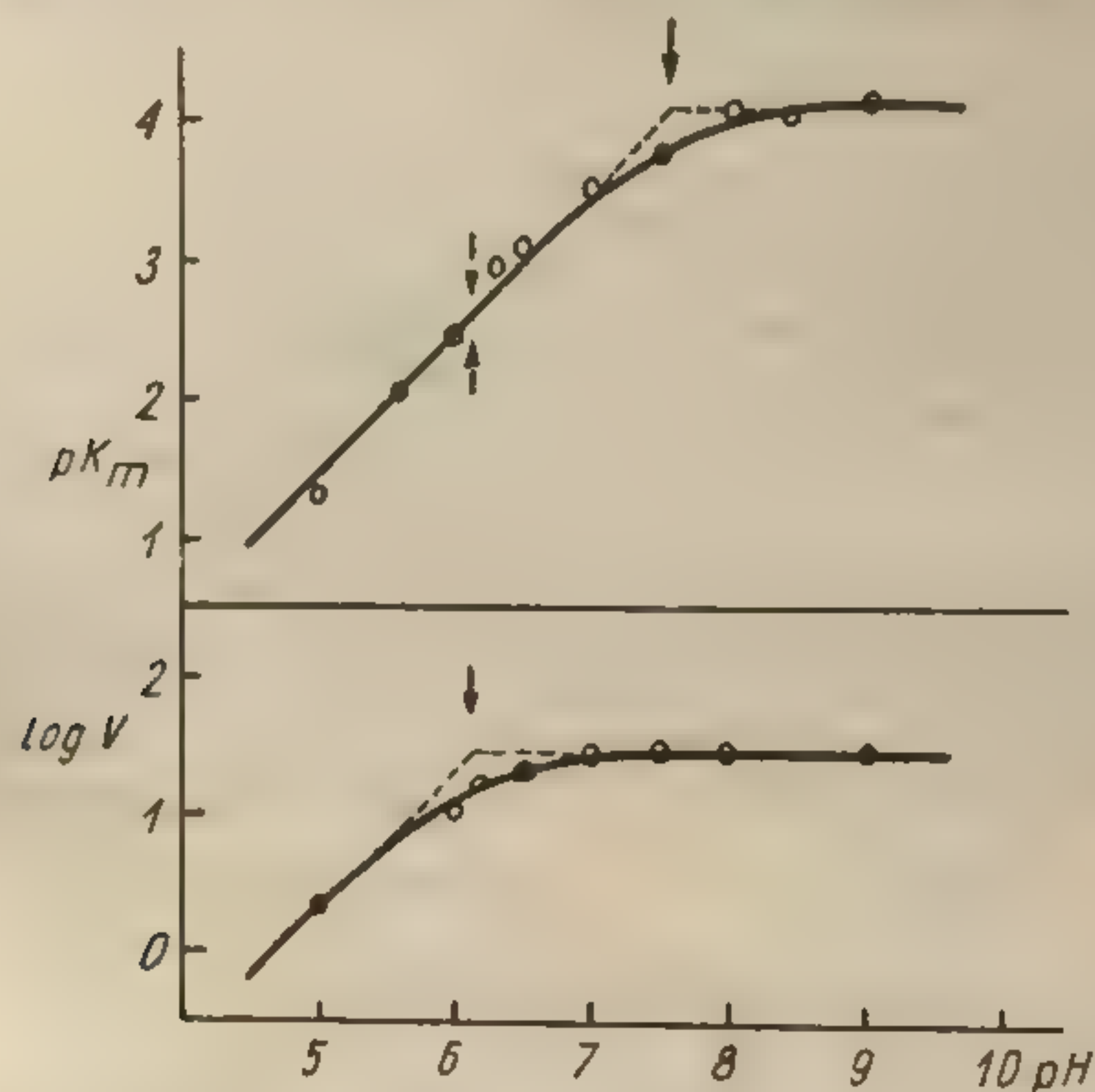


Рис. 17. Влияние pH на K_m и V для холинэстеразы, действующей на ацетилхолин (Dixon, 1953 и Laidler, 1955).

турация фермента. В пределах pH, в которых белок не изменяется, реакция среды оказывает обратимое влияние на ферментативную активность.

Оптимум pH является результатом взаимодействия ряда факторов. Оптимум может быть результатом обратимого влияния на максимальную скорость реакции V или же результатом воздействия на сродство субстрата к ферменту. При исследовании активности фермента в более широком диапазоне pH, реакция может необратимо инактивировать фермент по обеим сторонам оптимума. Это легко доказать, инкубируя ряд проб в буферах с разным pH, с последующим изменением pH, согласно условиям теста, и определением активности фермента.

Можно исключить влияние pH на сродство (связывание субстрата), применяя высокие концентрации субстрата так, чтобы насытить им фермент. Таким образом создаются оптимальные условия для исследования pH на ферментативную активность. Рекомендуется производить достаточное количество измерений для каждого pH, чтобы вычислить V и K_m .

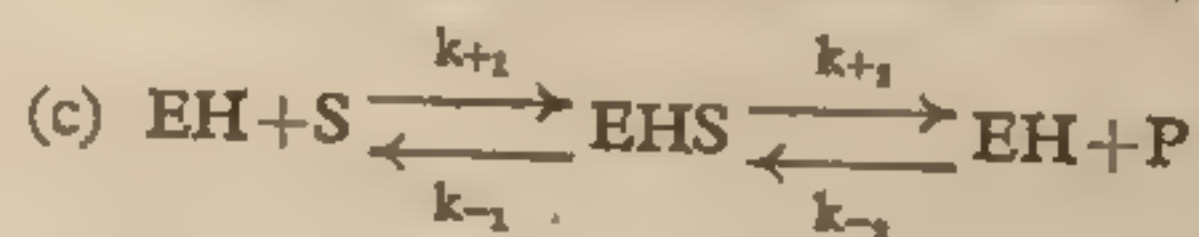
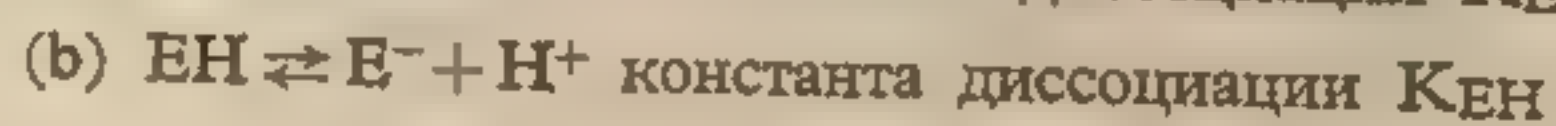
Большинство графических изображений зависимости активности фермента от pH представляет собой сложные кривые, иллюстрирующие влияние pH на V и на K_m . Примеры влияния pH на K_m и V изображены на рис. 17. На оси ординат откладываются $pK_m = -\log K_m$, на оси абсцисс — величины pH.

Изменения ферментативной активности при различных рН обуславливаются изменениями степени ионизации составных частей системы. Учитывая, что каталитическая активность проявляется обычно в довольно узком диапазоне рН, можно полагать, что только одна из многочисленных возможных ионных форм фермента обладает каталитической активностью, или точнее, одна из ионных форм каталитического центра. Поэтому влияние рН на скорость реакции исследуют по упрощенному способу, принимая, что активность зависит от кислотных и щелочных групп в каталитическом центре или по близости.

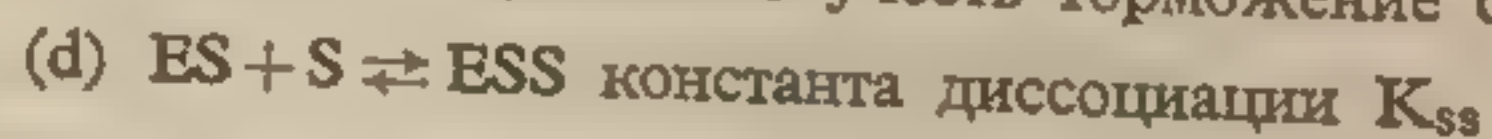
Субстрат и комплекс фермент-субстрат также могут подвергаться изменениям в отношении степени ионизации диссоциирующих групп, в зависимости от рН.

Если субстрат существует только в одной форме в исследуемом диапазоне рН, то изменения скорости реакции могут происходить только от изменений V или K_m . V может изменяться, как явствует из уравнения (9—10), если изменяется k_{+2} , $[E]$ или $[Z]$. Величина k_{+2} может быть функцией электрического поля, действующего в каталитическом центре. Если только одна из ионных форм каталитического центра способна катализировать реакцию, так что k_{+2} равняется нулю или принимает определенную величину, то легче интерпретировать влияние рН принимая, что колеблется концентрация активного фермента $[E]$.

Обычно рассматривают влияние рН на скорость ферментативной реакции с учетом ионизации двухосновной кислоты, т.е. пользуясь представлениями только о двух ионизирующих группах фермента (каталитического центра). Следовательно, можно постулировать существование трех форм фермента: EH_2^+ , EH и E^- — различающихся между собой только содержанием водородного иона. EH представляет собой активную форму. Это относится к ацетилхолинэстеразе (70). Реакция идет по следующим этапам:



Для этого фермента необходимо добавочно учесть торможение субстратом:



Уравнение соотношения скоростей реакции для стационарного состояния:

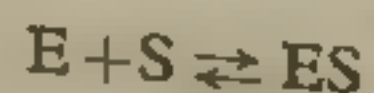
$$\frac{v_0}{v} = \frac{K_m[H^+]}{(K_{EH_2^+})(K_m + [S] + [S]^2/K_{ss})} + \frac{K_m K_{EH}}{[H^+](K_m + [S] + [S]^2/K_{ss})} \quad (31)$$

причем v_0 = скорость реакции при оптимуме рН.

Из уравнения вытекает, что выражение $\frac{v_0}{v}$ изменяется линейно в зависимости от изменений $[H^+]$ или $[OH^-]$.

Теоретические выводы, сделанные на основании этого ряда уравнений, сходны с результатами экспериментального гидролиза ацетилхолина, проходящего при разных рН (8). Например, для EH_2^+ была найдена величина $7 \cdot 10^{-8} M$, что соответствует $pK_{EH_2^+} 7,2$. Это указывает на участие имидазольной группы гистидина, рК которой (для азота ядра) равняется 7,0.

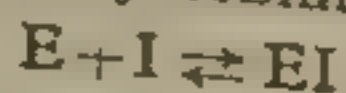
Влияние рН на ферментативную активность теоретически исследовал Dixon (71). Он выразил равновесие между ферментом и субстратом, или ферментом и ингибитором при помощи логарифмической функции. И так $pS = -\log [S]$, а $pI = -\log [I]$. В таком случае для уравнения:



равновесие между ферментом и субстратом принимает следующую логарифмическую форму:

$$pS = pK_s - \log \frac{[ES]}{[E]} \quad (32)$$

По аналогии с реакцией идущей в присутствии ингибитора и выраженной уравнением



имеется

$$pI = pK_i - \log \frac{[EI]}{[E]} \quad (33)$$

Представляя в графической форме зависимость степени диссоциации от pH раствора, получаем типичную кривую в виде буквы S, которая тождественна с кривой зависимости pS или pI от степени связывания субстрата или ингибитора ферментом. Влияние pH на степень связывания фермента с субстратом или ингибитором зависит от хода ионизации свободного или связанного фермента. Эту зависимость выражает уравнение

$$pK_s = pK_{s0} + \log \phi(ES) - \log \phi(E) - \log \phi(S) \quad (34)$$

в котором pK_{s0} означает величину pK_s для неионизированной системы, а $\phi(ES)$, $\phi(E)$ и $\phi(S)$ являются функциями pH для ES, E и S. Эти функции имеют следующую форму

$$1, 1 + \frac{K_1}{[H^+]}, 1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1 K_2}{[H^+]^2}, \text{ и т. д.}$$

где K_1 , K_2 и т.д. являются константами ионизации кислых групп соответственно к 0, 1, 2 или большему количеству ионизированных групп.

Особый интерес представляют зависимости между pH и pK_s или pK_i . Наклон кривой pK_s или pK_i по отношению к pH численно равняется изменению заряда при диссоциации комплекса фермент-субстрат, или фермент-ингибитор. Каждое изменение направления кривой соответствует ионизации одной группы в одном из компонентов ферментативной системы, т.е. в ферменте, субстрате или ингибиторе.

Помимо сказанного, кривая дает следующую информацию: наклон кривой указывает на связь между ферментом и субстратом, изгибы кривой говорят о величинах pK для групп, находящихся в активном центре. Из мнимых величин pK для комплекса фермент-субстрат можно делать выводы о сути процесса активации.

У нескольких ферментов была исследована зависимость между отрицательным логарифмом константы Михаэлиса, pK_m и pH. Рис. 18 представляет графическое изображение этой зависимости.

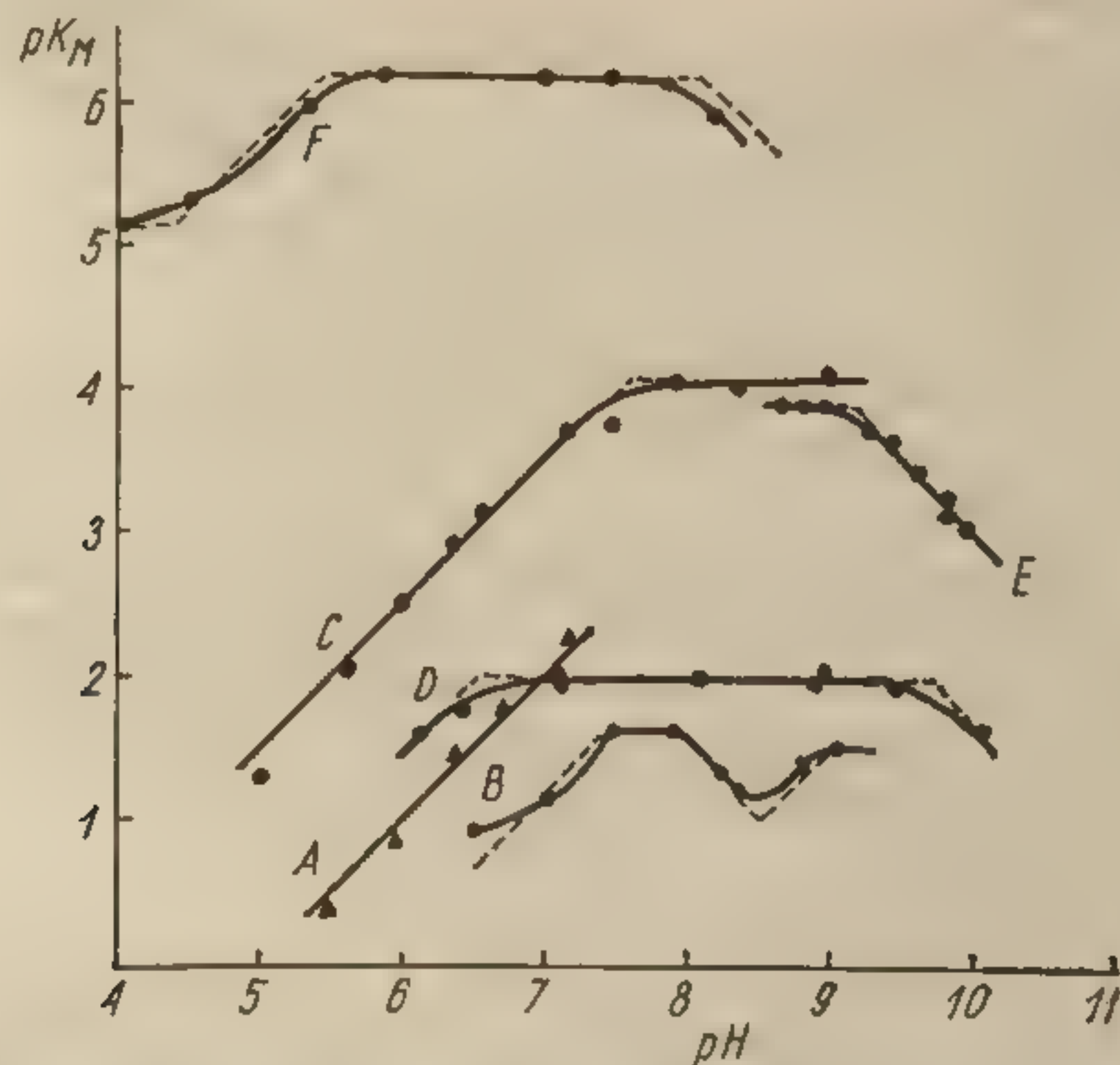


Рис. 18. Изменения pK_m в зависимости от изменений pH. А — для уреазы; В — для карбоксипептидазы; С — для холинэстеразы; D — для аргиназы; Е — для фосфатазы; F — для ксантин-оксидазы (Dixon, 1953, а также Neurath и Schwert, 1950, карбоксипептидаза).

Особенно интересны кривые рис. 19. Они изображают зависимость гидролиза трех арилсульфатов бактериальной арилсульфатазой. Изменения направления при pH 7,6—7,9, при 8,0—8,2 и 9,2—9,4 являются общими для всех трех субстратов. Так как ни один из них не обладал (на основании кривой потенциометрического титрования) ионизирующими групп-

пами с pK приближенным к этим величинам; они, по-видимому, относятся к характеристике фермента или комплекса фермент-субстрат. Перемена направления поблизости pH 7,6 приписывается ионизации комплекса, а изменения при pH приближенном к 8,2 и 9,4 — ионизации свободного фермента. Изменение при pH вблизи 6,6 для субстрата А соответствует

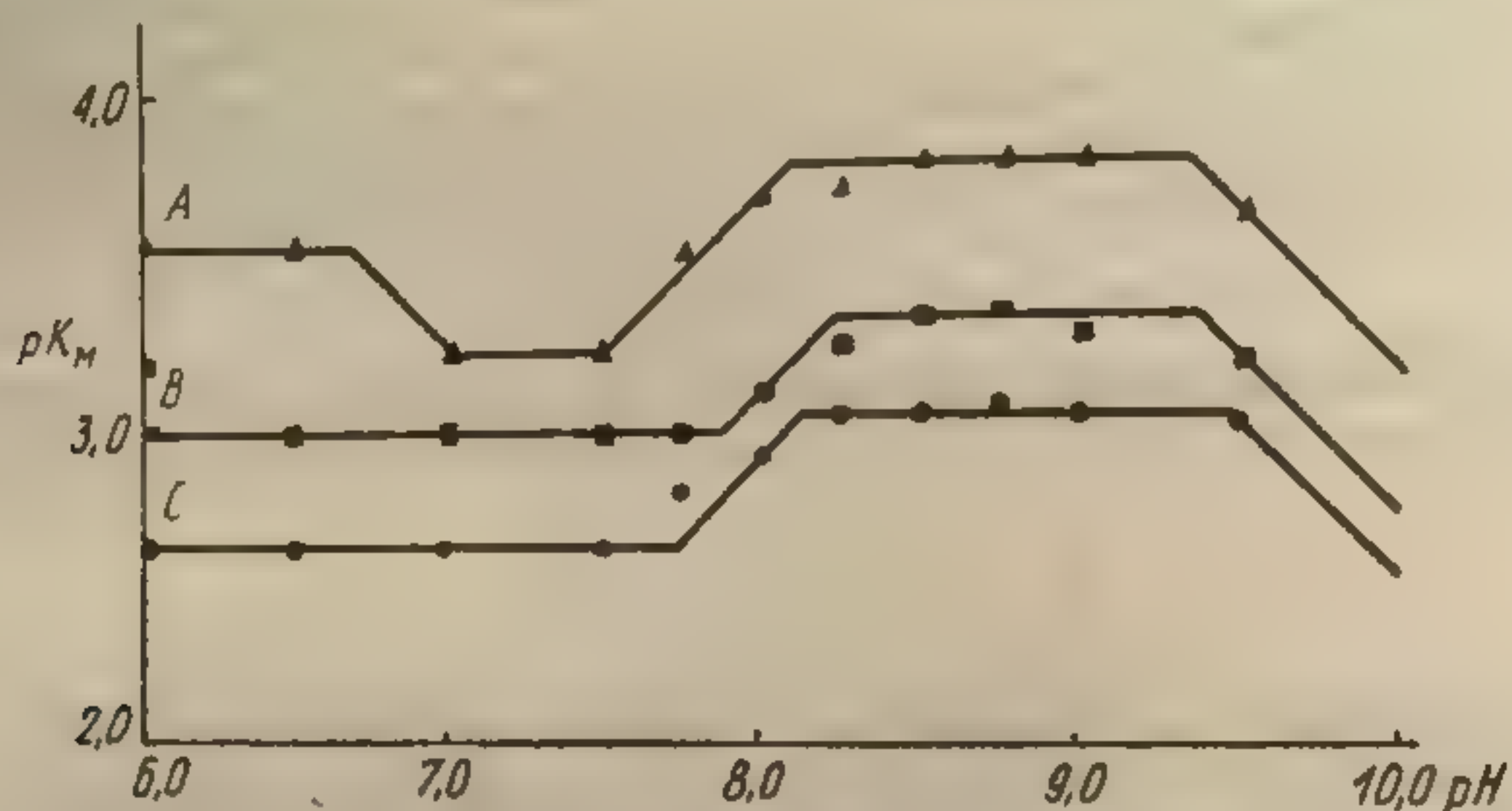


Рис. 19. Изменения pK_m в зависимости от изменения pH для (А) нитрокатехолсульфата, (В) п-нитрофенилсульфата и (С) п-ацетилфенилсульфата в качестве субстратов (Dodgson и сотр., 1955).

ионизации свободной фенольной группы субстрата (pH которой равно 6,9); изменение направления кривой при pH 7,0 происходит от ионизации этой группы в комплексе фермент-субстрат.

Влияние pH на K_m , V и скорость ферментативных реакций описал Laidler (72).

Для ряда изученных ферментативных реакций были получены данные, указывающие на участие двух ионизирующих групп в каталитическом центре. За исключением ацетилхолинэстеразы, у всех исследуемых ферментов реагирует промежуточная форма комплекса фермент-субстрат (ESH), которая дает продукты реакции. Для пепсина, ацетилхолинэстеразы, бета-амилазы и уреазы следует принять участие только одной щелочной группы в каталитическом центре. Остальные ферменты образуют комплекс с субстратом при участии щелочной и кислой групп. Все исследуемые ферменты связывают субстрат не только при помощи кислотных групп. Оба рода групп, кислотная и щелочная, принимают участие в активации комплекса фермент-субстрат.

Активация фермента ионами металлов. Некоторые ферменты становятся полностью активными лишь в присутствии ионов определенных металлов в растворе. Удаление металла путем диализа вызывает обратимую потерю активности, рекомбинация восстанавливает активность. К таким ферментам принадлежат лейцинаминопептидаза, активируемая ионом марганца, или глицилглицин-дипептидаза, активируемая ионом кобальта, алкоголь-дегидрогеназа и карбоангидраза активируемые ионом цинка и др.

Кинетические исследования многочисленных ферментных систем, активируемых ионами металлов, обнаружили двоякую роль этих металлов. Некоторые ферменты нуждаются в металлах для соединения фермента с субстратом, для других они являются основным компонентом каталитического центра. Примером функции первого рода являются реакции гидролиза и переноса ацильных групп, в которых металлический ион соединяет субстрат с ферментом. Ионы металлов принимают активное участие в каталитических процессах ферментов, переносящих водород или электроны.

Читатель найдет детальный кинетический анализ активации ферментов металлами в статье Vallee (73).

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА СКОРОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

С ростом температуры ускоряется ферментативная реакция. Дойдя до известного оптимума, при данных условиях, скорость реакции понижается, обычно впоследствии термической инактивации фермента или тепловой денатурации.

Влияние температуры на активность фермента, мерой которой является начальная скорость реакции, может быть весьма сложным. Это касается в первую очередь стойкости фермента, затем скорости распада комплекса фермент-субстрат, сродства фермента с активаторами или ингибиторами, функции рН всех составляющих реагирующей системы, обусловленных изменениями их рК, связанными с теплотой ионизации.

Влияние температуры на стойкость фермента исследуют подвергая последний воздействию разных температур в течение определенного времени и измеряя впоследствии его активность в условиях, гарантирующих стойкость фермента. Влияние температуры на сродство исключается путем насыщения фермента субстратом или ингибитором, с тем чтобы изучать влияние температуры на максимальную скорость реакции, V . Можно также произвести анализ зависимости константы Михаэлиса, K_m от температуры и даже в некоторых случаях изучить влияние температуры на три константы реакции k_1 , k_{-1} и k_{+2} . Отдельно определяют влияние температуры на рК компонентов реактивной системы.

Типичный ход скорости реакции и зависимости от температуры иллюстрирует диаграмма (74).

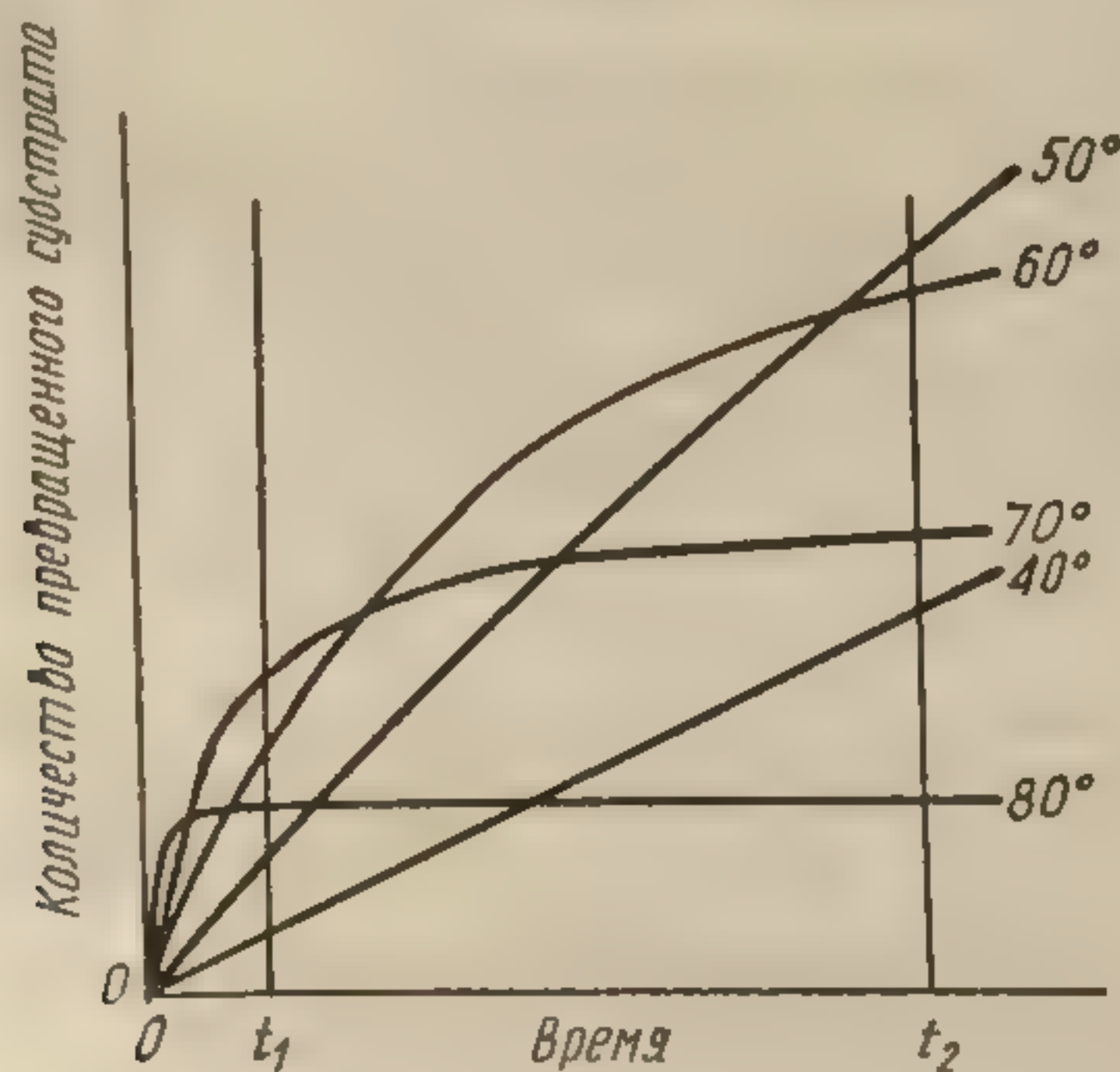


Рис. 20.

Первоначально эта скорость, измеряемая количеством превращенного или разложенного субстрата увеличивается до определенного оптимума, а потом падает. Оптимальная температура также не постоянна. Она понижается с удлинением времени измерения активности фермента. Это явление вызывается двумя различными причинами, а именно или ростом начальной скорости реакции или разложением фермента при более высокой температуре.

Скорость инактивации ферментов в растворе резко повышается с температурой. Большинство ферментов необратимо теряет активность при температуре выше 65° и лишь немногие выдерживают кратковременное кипячение

(рибонуклеаза, аденилаткиназа, трипсин при рН 1). Инактивация фермента теплотой является последствием денатурации белка. Температурный коэффициент этой инактивации значительно выше, чем для других реакций, за исключением денатурации белка. Параллельность процессов инактивации и денатурации, определяемых независимыми способами, была доказана для ряда ферментов.

Скорость термической инактивации ферментов преимущественно зависит от рН раствора. Обычно наблюдается диапазон рН, при котором фермент сохраняет стойкость, необязательно поблизости изоэлектрической точки. Ряд ферментов теряет активность уже ниже рН 5 или выше рН 8. Итак при анализе влияния температуры на ферменты применяется широкий диапазон рН. Также и другие факторы влияют на параметры инактивации: концентрация белков, предохраняющее действие субстратов, ионная сила растворов и т.п. Сухие ферменты сохраняют активность при намного более высокой температуре. Поэтому рекомендуется лиофилизировать ферменты предназначенные для хранения.

Коэффициент температуры химической реакции определяется уравнением

$$Q_{10} = \frac{\text{скорость реакции при } (T^0 + 10^\circ)}{\text{скорость реакции при } T^0}$$

имеющим отношение к уравнению Аррениуса для энергии активации

$$\log Q_{10} = \frac{A}{2,303 \cdot R} \cdot \frac{T_2 - T_1}{T_2 T_1}$$

Исследование температурного коэффициента в ферментативных реакциях дало результаты от 1,4—2,0. Во всех случаях температурные коэффициенты в ферментативных реакциях были ниже, чем в реакциях некатализируемых или катализируемых без участия ферментов. Соответственно ниже была и энергия активации ферментативных реакций.

Кинетика ферментативных реакций при различных непостоянных температурах играет большую роль в попытках выяснить механизм реакций. Константа равновесия K и абсолютная константа скорости k связаны с термодинамическими функциями

$$\begin{aligned} (a) \quad -RT \ln K &= \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = \Delta E^0 - T\Delta S^0 + p\Delta V^0 \\ (b) \quad -RT \ln k + RT \ln (kT/h) &= \Delta G^{0*} = \Delta H^{0*} - T\Delta S^{0*} = \\ &= \Delta E^{0*} - T\Delta S^{0*} + p\Delta V^{0*} \end{aligned}$$

в которых G^0 , H^0 , S^0 и E^0 представляют термодинамические величины в стандартных условиях, а именно свободную энергию, энтальпию, энтропию и внутреннюю энергию, k и h являются константами Больцманна и Планка, а V^0 объемом. Звездочка означает, что молекула находится в активном состоянии. Стандартная энтальпия активации H^{0*} в условиях постоянного давления называется стандартной теплотой активации.

Легче всего при изучении ферментов определить термодинамическую величину H^{0*} , т.е. стандартную теплоту активации для разложения комплекса фермент-субстрат в фермент и продукты реакции. При постоянной концентрации фермента и второго субстрата максимальная скорость реакции V пропорциональна постоянной скорости этой реакции. Измеряя изменения V , в зависимости от изменений температуры, можно определить E^{0*} или H^{0*} . Зависимость между $\log V$ и $1/T$ имеет линейную форму для фосфатазы костей в интервале от 12,0° до 42,4° (75).

При заданной концентрации активного фермента можно также определить изменения стандартной энтропии активации, ΔS^0 . Сравнение данных показало, что энтропии активации ферментативных и неферментативных реакций имеют один и тот же порядок. Итак, более высокая эффективность ферментативного катализа является результатом уменьшения теплоты активации. Сравнительная сводка нескольких примеров представлена в таблице 4.

Таблица 4

Теплота активации катализируемых и некатализируемых реакций (76)

Субстрат	Катализатор	H^0 (ккал/моль)
Перекись водорода	отсутствует	18,0
	I^-	13,5
	каталаза	6,4
Сахароза	H^+	25,6
	β -фруктофуранозидаза	11,0
Углекислота	отсутствует	20,5
	карбоангидраза	11,7
Мочевина	H^+	24,5
	уреаза	12,5

Eyring и соотр. (77) предполагают, что активированный комплекс фермент-субстрат (переходное состояние) немногим отличается от нормального, так как прирост энергии, приблизительно на 20 ккал. (для преодоления энергетического барьера этого состояния) может лишь в незначительной степени деформировать или растянуть связи. С другой стороны, было доказано (78), что активный центр и чувствительные химические группы субстрата иногда подвергаются заметным деформациям при активации комплекса фермент-субстрат.

Определение константы диссоциации комплекса фермент-субстрат при различных температурах показывает изменение стандартной теплоты (ΔH^0)

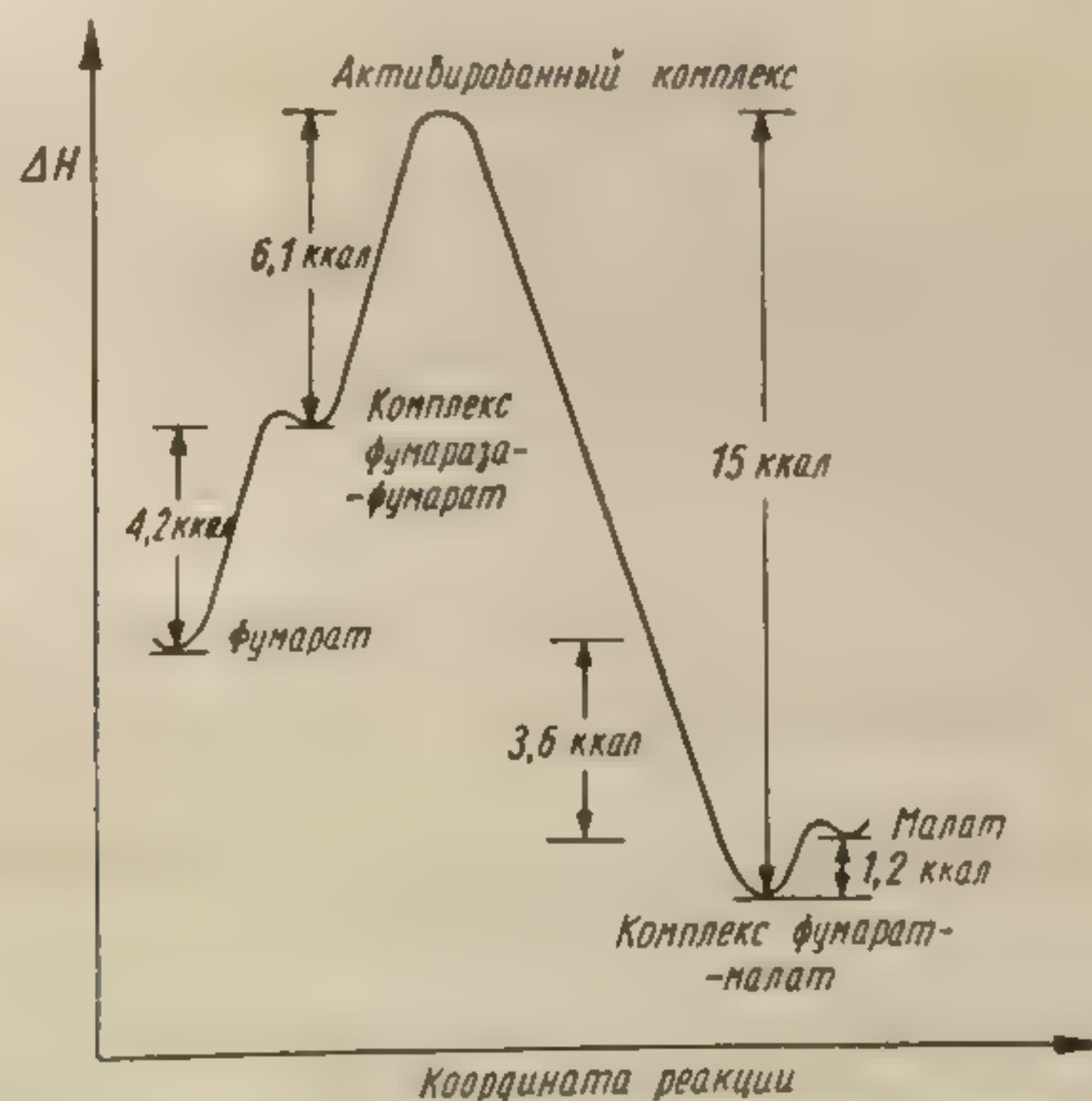
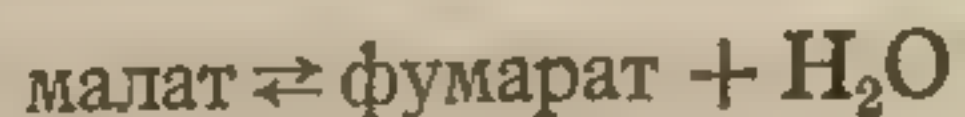


Рис. 21. Изменения энтальпии реакции гидратации фумарата в малат (Massey, 1953).

и стандартной энтропии (ΔS^0) образования комплекса фермент-субстрат. Сумма теплоты образования и теплоты активации комплекса фермент-субстрат, как для прямой, так и для обратной реакции представляют ту же величину, что и суммарная теплота реакции. Это положение подтвердилось исследованиями Massey (79) на фумаразе, катализирующей реакцию:



Автор составил диаграмму изменений энтальпии в ходе этой реакции (рис. 21), или ее энергетический профиль.

Имеется очень мало данных о теплоте и энтропии активации для образования и диссоциации комплекса фермент-субстрат, так как константы скорости, k_{+1} и k_{-1} известны лишь у немногих ферментов. Однако известно, что образование первичного комплекса между каталазой и ее субстратом требует небольшой теплоты (около 1,4 ккал./моль).

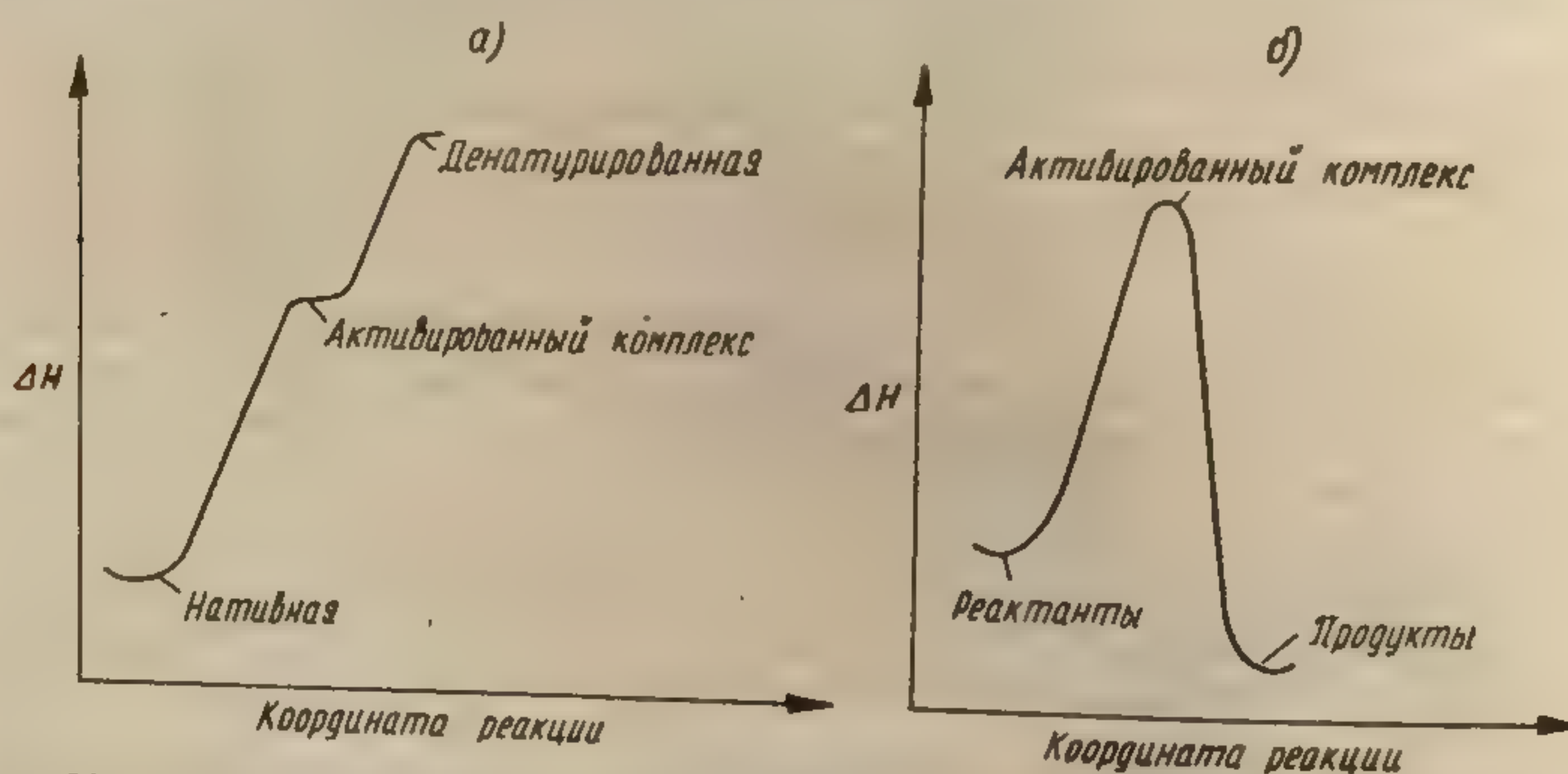


Рис. 22. Кривая изменений ΔH во время (а) денатурации трипсина; (б) при обычной химической реакции.

При высоких температурах ферменты инактивируются необратимо. В таких случаях теплота активации весьма велика, также, как и температурный коэффициент. В некоторых случаях денатурация фермента обратима, и тогда возможно измерение равновесия между активной и неактивной формой фермента. Например опыты с трипсином (80) в 0,01 Н НСl. Теплота денатурации (при 212 кал/моль/градус. Теплота и энтропия активации для денатурации равняется 40,2 ккал/моль и 44,7 кал/моль/градус. Необычно то, что теплота и энтропия процесса больше теплоты и энтропии активации того же процесса. Это отклонение типично для денатурации белка.

Сопоставление изменений энтальпии (ΔH) во время денатурации фермента и при обычной химической реакции представлено на рис. 22.

СТРУКТУРНАЯ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ

Главным свойством ферментов, отличающим их от других катализаторов, является высокая специфичность, состоящая в катализировании химической реакции, ограниченной субстратом определенного строения. Эта избиратель-

ная каталитическая специфичность имеет огромное значение для организации метаболических путей, характерных для живого вещества. Эффективность и организация внутриклеточных биохимических реакций в значительной степени зависят от избирательной активности ферментов, которые при большом количестве субстратов и возможных химических реакций регулируют только одну. Итак, каталитическая специфичность направляет течение реакций по соответствующим метаболическим путям.

Существует широкий диапазон специфичности среди ферментов. Во многих случаях фермент действует только на одно определенное химическое соединение или на одну из возможных пространственных конфигураций, производя в нем определенные химические превращения. В других случаях он действует на группу соединений, сходных по структуре, катализируя одну и ту же реакцию. Субстраты этой реакции обнаруживают, как правило, основное сходство структуры, и можно легко определить, какая химическая группировка, присущая всем соединениям, обуславливает каталитическую активность. В ферментах с мало выраженной специфичностью необходимая для активности часть структуры субстрата, например эфирная связь, является малой частицей молекулы, так, что остальная часть молекулы субстрата может быть разной структуры.

Исследовать специфичность ферментов нелегко; поэтому взгляды на специфичность отдельных ферментов довольно часто меняются, по мере совершенствования исследовательской техники. Основным условием является особая чистота ферментных препаратов и субстратов. Большинство собранных до сих пор данных касается ферментов, загрязненных в большей или меньшей степени другими ферментами, иначе действующими на тот же субстрат. Лишь небольшое число ферментов было получено в настолько гомогенном состоянии, что можно было окончательно определить их каталитическую специфичность. Также и удовлетворительная очистка субстрата играет большую роль, особенно в тех случаях если неактивный пространственный изомер может тормозить исследуемую реакцию.

Для исследования специфичности пользуются в качестве сравнительного субстрата таким соединением, которое разлагается данным ферментом с наибольшей скоростью, и находят оптимальные условия для этого теста. Другие возможные субстраты для этого фермента исследуются при тех же условиях концентрации, температуры, рН, рода буферов и ионной силы. Для получения количественных данных составляют диаграмму Lineweaver и Burk для каждого субстрата и определяют V и K_m путем экстраполяции. Затем производят те же исследования при различных рН, так как отдельные формы диссоциации субстратов могут отличаться разной степенью сродства с ферментом, и тем самым давать различные кривые зависимости V и K_m от рН. Для каждого опыта отдельно определяют V и K_m чтобы изучить влияние структуры субстрата на его сродство с ферментом и на стойкость комплекса фермент-субстрат.

Если даже фермент действует исключительно на один определенный субстрат, то можно исследовать влияние структуры субстрата на сродство с ферментом, используя конкурентное торможение ингибиторами, при $V = 0$. В этих случаях вместо K_m вычисляют K_i .

Если один и тот же ферментный препарат катализирует две разные реакции (например трипсин, разрывает пептиды и пептидные эфиры), и если он не удовлетворяет всем требованиям гомогенности, необходимо установить, что один и тот же фермент несет ответственность за две каталитические функции. Такое положение можно будет считать доказанным, если в процессе многочисленных и разнородных фракционирований не удастся разделить эти

функции по фракциям. Существенные сведения дает также изучение соотношения обеих активностей во время очистки и во время инактивации фермента, так как трудно предположить, что различные денатурирующие факторы одинаково действуют в количественном отношении на разные ферменты.

Влияние ингибиторов можно также использовать для определения числа ферментов. Если один фермент катализирует более одного типа реакции, разные субстраты должны показать одну и ту же величину K_i . Наконец, положительный результат пробы со смесью субстратов, т.е. ускорение реакции путем добавления второго субстрата по отношению к тесту с одним субстратом может указывать на присутствие более одного фермента в исследуемом препарате.

Наконец, необходимо подчеркнуть значение ионов металлов, которые могут влиять на диапазон специфичности фермента, в зависимости от рода иона.

Различные группы ферментов заметно отличаются друг от друга по степени специфичности. Многие ферменты обладают высокой специфичностью. Это относится главным образом к оксидоредуктазам, синтетазам и фосфокиназам, а также к некоторым гидролазам. Если катализируется двухмолекулярная реакция, то специфичность касается обоих субстратов. В некоторых случаях, однако, фермент бывает высоко специфичным для одного субстрата (НАД), а мало специфичным для второго (спирты). Таким ферментом является, например алкоголь-дегидрогеназа. В числе малоспецифических ферментов находятся некоторые гидролазы (эстеразы и пептидазы), действующие на широкий ассортимент субстратов типа эфиров и пептидов, хотя и среди них встречаются отдельные ферменты с высокой специфичностью по отношению к субстратам.

Существуют немногие ферменты с двойной специфичностью по отношению к химически различным субстратам. Так, ксантиноксидаза, которая отличается большой избирательностью по отношению к пуриновым основаниям, окисляет также разные альдегиды, а оксидаза печени, помимо альдегидов, окисляет производные пиридина. Также редко встречаются случаи катализа двух разных реакций у одного и того же субстрата. К ним принадлежит действие малат- и изоцитрат-дегидрогеназы (декарбоксилирующей), которые могут декарбоксилировать или восстанавливать соответствующие кетокислоты.

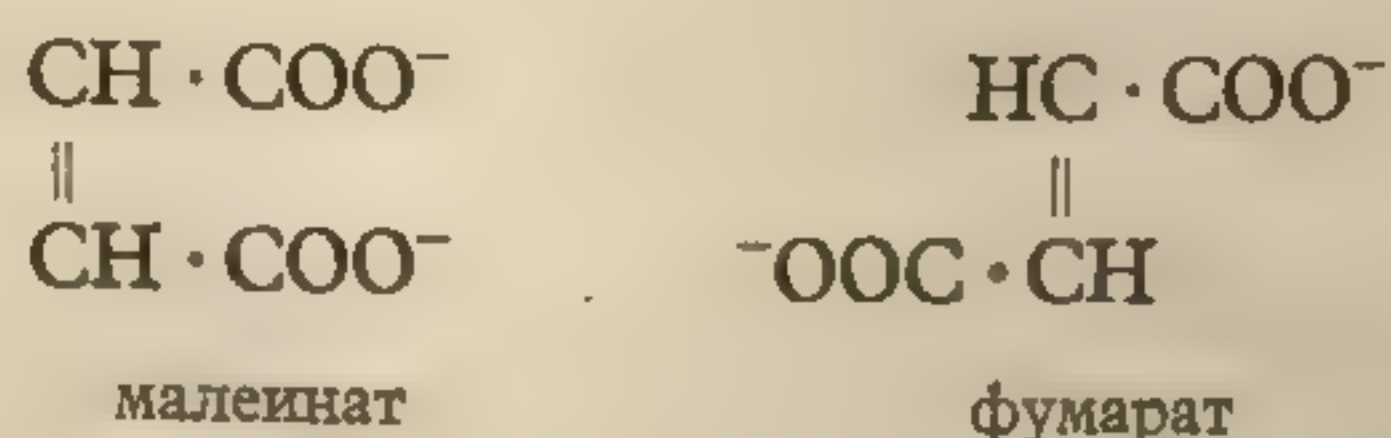
Основной чертой специфичности ферментов является факт, что они избирательны не только в химическом, но и в пространственном отношении. Это значит, что они действуют на субстраты или производят продукты, содержащие асимметрические атомы углерода, причем они активны только по отношению к одному из зеркальных изомеров. Специфичность этого типа абсолютна, за исключением ферментов типа рацемаз, в которых обе формы оптических изомеров переходят друг в друга. Реакция проходит всегда через этап промежуточного соединения, в котором нет асимметрического углерода.

Если фермент действует на рацемическую смесь форм D- и L- то разлагается только одна из них и реакция прекращается с исчезновением половины субстрата (если равновесие реакции сильно смещено вправо). Если фермент катализирует реакцию, в ходе которой образуется асимметрический атом углерода, продукт реакции содержит только один из пространственных изомеров. Этот процесс называется „асимметрическим синтезом“, в отличие от катализируемого химического синтеза, при котором всегда получается рацемат.

Если в реакции образуются два асимметрических центра, то каждый из них оказывает отдельное влияние на ферментативную специфичность. Например, под влиянием треонин-альдолазы образуется из глицина и альдегида только L-треонин. Та же реакция проходит иначе в присутствии другого фермента, например аллотреонинальдолазы, причем возникает только L-алю-

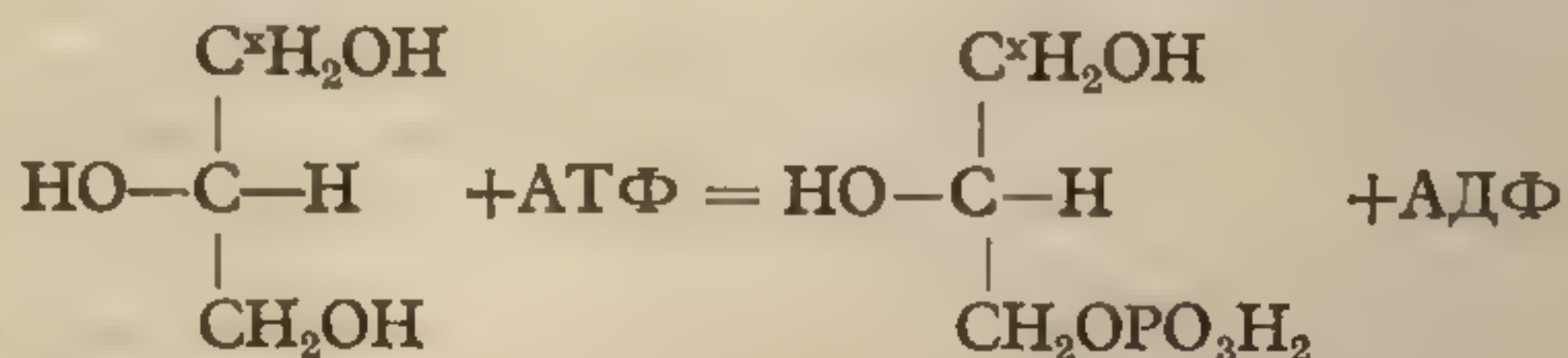
треонин. Каждый из этих ферментов пространственно абсолютно специфичен и различает два соседних центра асимметрии.

Активность фермента зависит также от других типов геометрической изомерии. Если субстрат имеет конфигурацию цис- или транс-, то фермент реагирует лишь с одной из пространственных конфигураций. Фумарат гидратаза (фумараза) например, действует только на фумарат, а не действует на малеинат. Из малата под влиянием фумаразы получается только фумарат, а не малеинат.



Есть однако, ферменты, действующие на оба геометрических изомера (цис-транс). Это т.н. цис-транс изомеры.

Некоторые ферменты различают химические группы в симметрично построенных молекулах. Примером является глицероль-киназа, катализирующая следующую реакцию:

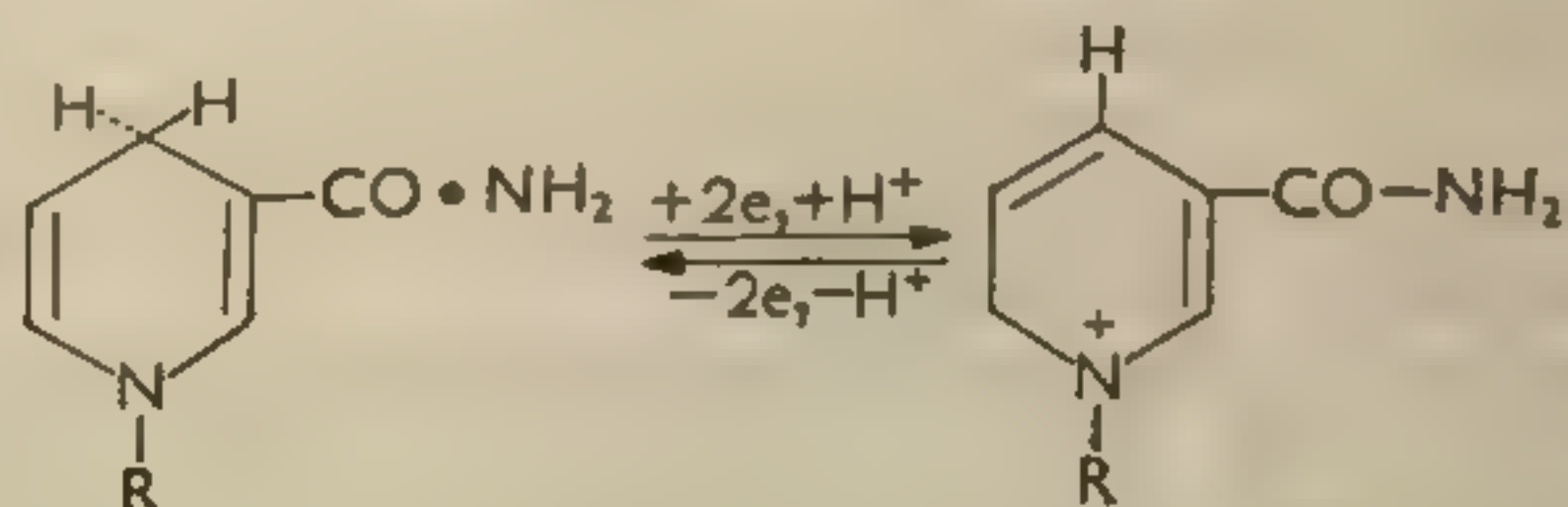


в которой один из α углеродов глицерина был мечен $^{14}\text{C}^*$.

Фосфорилирование происходит всегда на одной и той же первичной алкольной группе, а не на обеих. Подобное различие между симметричными химическими группами встречается и в некоторых других ферментативных реакциях.

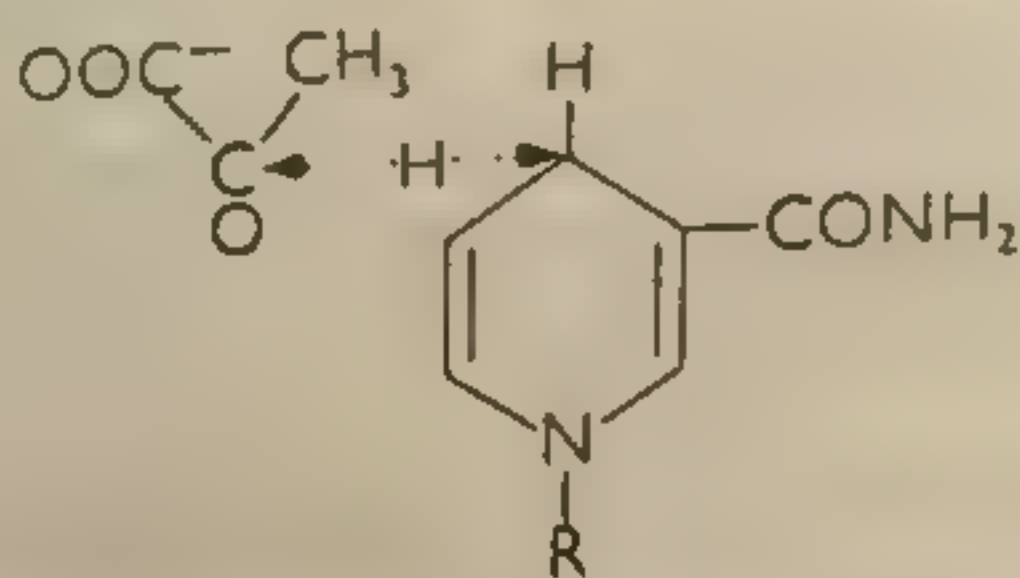
Этот тип специфичности фермента объясняется тем, что несмотря на совершенно симметричное строение субстрата, последний может связаться с ферментом только в одном положении. Это имеет место тогда, когда группы, связывающие субстрат в каталитическом центре, соединяются с тремя любыми подставляемыми группами субстрата.

Еще один тип пространственной специфичности встречается при окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых ферментами, активную группу которых составляет НАД. Дегидрогенация происходит на пиридиновом ядре в положении 4, причем из двух тождественных атомов водорода отрывается только один, согласно уравнению:



Лактатдегидрогеназа специфична по отношению к определенному атому водорода из этой пары, находящемуся под плоскостью кольца (альфа). Глицерофосфатдегидрогеназа переносит только атом водорода, находящийся над

плоскостью ядра (бета). Существование пространственной избирательности лактатдегидрогеназы по отношению только к одному атому водорода в субстрате иллюстрирует схема.



Многочисленные примеры специфичности ферментов собрали Dixon и Webb (50). Дискуссию над механизмом пространственной специфичности провел в последнее время Gutfreund (87). Он обратил внимание на то, что избирательная специфичность ферментов может относиться к каждому из двух основных актов ферментативного катализа. Первым из них является образование комплекса фермент-субстрат, вторым — изменение электронной конфигурации связи или активации субстрата.

Примером специфичности образования комплекса являются пептидазы. Образование комплекса фермент-субстрат зависит в данном случае от геометрии специфической группы субстрата, тесно прилегающей к поверхности фермента. Очередной акт, образование химической связи между реактивной группой субстрата и реактивным центром фермента, зависит от структурной и электронной конфигурации этого центра.

У разных ферментов эти два типа специфичности в неодинаковой степени влияют на эффективность катализа. Это объясняет разную активность фермента по отношению к ряду субстратов приближенной структуры.

Явления избирательной специфичности ферментов определяют развитие понятий об отношении фермента к субстрату и должны быть приняты во внимание в каждой теории механизма ферментативного катализа.

КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ФЕРМЕНТОВ

Классификация ферментов основана на рекомендациях Комиссии по ферментам Международного биохимического союза, одобренных Ассамблеей Международного биохимического союза на заседании V Международного биохимического конгресса в августе 1961 года, в Москве (61).

Основой классификации и номенклатуры ферментов должна быть суммарная катализируемая реакция (overall reaction), выражаемая уравнением. При этом не учитываются механизмы промежуточного образования комплексов субстрата с ферментом. Название фермента происходит от названия превращаемого вещества и окончания -аза. Такое название обязательно только для одиночного фермента; совокупность нескольких ферментов называется системой (например система оксидазы). Следовательно, необходимо избегать таких терминов, как например „циклофораза“.

Ферменты получают два рода названий: систематические и тривиальные (рабочее). Систематические названия присваиваются только тем ферментам, каталитическое действие которых полностью изучено. Это название должно отражать функцию фермента и должно идентифицировать данный фермент. Тривиальное название должно быть достаточно коротким для общего употребления. Такие названия уже имеются для большинства ферментов.

КЛЮЧ* К НУМЕРАЦИИ И КЛАССИФИКАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
-----------------	-----------------------------	-----------------------------------	---------

1. ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

1.1. Действуют на СН—ОН группу доноров

1.1.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.1.1.1	Алкоголь: НАД-оксидоредуктаза	Алкогольдегидрогеназа	Алкоголь + НАД = альдегид или кетон + НАД · Н ₂
1.1.1.8	L-глицерол-3-фосфат: НАД-оксидоредуктаза	Глицерофосфат-дегидрогеназа	L-глицерол-3-фосфат + НАД = диоксиацетонфосфат + НАД · Н ₂
1.1.1.27	L-лактат: НАД-оксидоредуктаза	Лактатдегидрогеназа	L-лактат + НАД = пируват + НАД · Н ₂
1.1.1.47	β-D-глюкоза: НАД(Ф)-оксидоредуктаза	Глюкозодегидрогеназа	β-D-глюкоза + НАД(Ф) = D-глюконо-δ-лактон + НАД(Ф) · Н ₂

1.1.2 Акцептором служит цитохром

1.1.2.1	L-глицерол-3-фосфат: цитохром-с-оксидоредуктаза	Глицерофосфат-дегидрогеназа	L-глицерол-3-фосфат + феррицитохром с = диоксиацетонфосфат + ферроцитохром с
---------	---	-----------------------------	--

1.1.3 Акцептором служит O₂

1.1.3.4	β-D-глюкоза: O ₂ -оксидоредуктаза	Глюкозооксидаза	β-D-глюкоза + O ₂ = D-глюконо-δ-лактон + H ₂ O ₂
---------	--	-----------------	---

1.2. Действуют на альдегидную или кетонную группу доноров

1.2.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.2.1.12	D-глицеральдегид-3-фосфат: НАД-оксидоредуктаза (фосфорилирующая)	Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; триозофосфатдегидрогеназа	D-глицеральдегид-3-фосфат + фосфат + НАД = D-1,3-дифосфоглицериновая кислота + НАД · Н ₂
----------	--	--	---

1.2.2 Акцептором служит цитохром

1.2.2.2	Пируват: цитохром-оксидоредуктаза	Пируватдегидрогеназа	Пируват + феррицитохром = ацетат + CO ₂ + ферроцитохром
---------	-----------------------------------	----------------------	--

1.2.3 Акцептором служит O₂

1.2.3.2	Ксантин: O ₂ -оксидоредуктаза	Ксантинооксидаза	Ксантин + H ₂ O + O ₂ = урат + H ₂ O ₂
---------	--	------------------	--

1.2.4 Акцептором служит липоат

1.2.4.1	Пируват: липоат-оксидоредуктаза (ацетилирующая акцептор)	Пируватдегидрогеназа	Пируват + окисленный липоат = 6-S-ацетилгидролипид + CO ₂
---------	--	----------------------	--

* В сокращенном виде.

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
-----------------	-----------------------------	-----------------------------------	---------

1.3. Действуют на СН—СН группу доноров

1.3.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.3.1.3	4,5-дигидрокортисон: :НАДФ-оксидоредуктаза	Кортисонредуктаза	4,5-дигидрокортисон + +НАДФ = кортисон + +НАДФ · Н ₂
---------	---	-------------------	---

1.3.2 Акцептором служит цитохром

1.3.2.1	Бутирил-КоА: цитохром с-оксидоредуктаза	Бутирил-КоА-дегидро- геназа	Бутирил-КоА + ферри- цитохром с = кротонил- -КоА + ферроцитохром с
1.3.2.2	Ацил-КоА: цитохром с- оксидоредуктаза	Ацил-КоА-дегидроге- наза	Ацил-КоА + ферриcito- хром с = 2,3-дегидроацил- -КоА + ферроцитохром с

1.3.99 Используют другие акцепторы

1.3.99.1	Сукцинат: (акцептор)- оксидоредуктаза	Сукцинатдегидрогеназа	Сукцинат + акцептор = фумарат + восстановлен- ный акцептор
----------	--	-----------------------	--

1.4. Действуют на СН—NH₂ группу доноров

1.4.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.4.1.3	L-глутамат: НАД(Ф)-ок- сидоредуктаза (дезами- нирующая)	Глутаматдегидрогеназа	L-глутамат + Н ₂ O + + НАД(Ф) = 2 оксоглу- тарат + NH ₃ + НАД(Ф) · · Н ₂
---------	---	-----------------------	--

1.4.3 Акцептором служит O₂

1.4.3.1	D-аспартат: O ₂ -оксидо- редуктаза (дезаминирую- щая)	D-аспартат-оксидаза	D-аспартат + Н ₂ O + O ₂ = = оксалоацетат + NH ₃ + + Н ₂ O ₂
1.4.3.2	L-аминокислота: O ₂ -ок- сидоредуктаза (дезами- нирующая)	Оксидаза L-аминокислот	L-аминокислота + Н ₂ O + + O ₂ = α-кето (2-оксо)ки- слота + NH ₃ + Н ₂ O ₂
1.4.3.3	D-аминокислота: O ₂ -ок- сидоредуктаза (дезамини- рующая)	Оксидаза D-аминокислот	D-аминокислота + Н ₂ O + + O ₂ = α-кето (2-оксо)- кислота + NH ₃ + Н ₂ O ₂
1.4.3.4	Моноамин: O ₂ -оксидоре- дуктаза (дезаминирую- щая)	Моноаминоксидаза	Моноамин + Н ₂ O + O ₂ = = альдегид + NH ₃ + Н ₂ O ₂
1.4.3.6	Диамин: O ₂ -оксидореду- ктаза (дезаминирующая)	Диаминоксидаза; гиста- миназа	Диамин + Н ₂ O + O ₂ = = аминоальдегид + NH ₃ + + Н ₂ O ₂

1.5. Действуют на С—NH группу доноров

1.5.1 Акцептором служит НАД или НАДФ

1.5.1.3	5,6,7,8-Тетрагидрофо- лят: НАД(Ф)-оксидоре- дуктаза	Тетрагидрофолятдегид- рогеназа	5,6,7,8-тетрагидрофолят + +НАД(Ф) = 7,8-дигид- рофолят + НАД(Ф) · Н ₂
1.5.1.4	7,8-Дигидрофолят: :НАДФ-оксидоредуктаза	Дигидрофолятдегидро- геназа	7,8-дигидрофолят + +НАДФ = фолят + +НАДФ · Н ₂

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
1.6. Действуют на НАД · Н₂ или НАДФ · Н₂ в качестве донора			
1.6.1 Акцептором служит НАД или НАДФ			
1.6.1.1	НАДФ · Н ₂ : НАД-оксидоредуктаза	НАД(Ф)-трансгидрогеназа	НАДФ · Н ₂ + НАД = = НАДФ + НАД · Н ₂
1.6.2 Акцептором служит цитохром			
1.6.2.1	НАД · Н ₂ : цитохром с-оксидоредуктаза	НАД · Н ₂ -цитохром с-редуктаза	НАД · Н ₂ + феррицитохром с = НАД + ферроцитохром с
1.6.4 Акцептором служит дисульфидное соединение			
1.6.4.2	НАД(Ф) · Н ₂ : глутатион-оксидоредуктаза	Глутатионредуктаза	НАД(Ф) · Н ₂ + окисленный глутатион = = НАД(Ф) + 2 восстановленный глутатион
1.6.4.3	НАД · Н ₂ : липоамид-оксидоредуктаза	Липоамиддегидрогеназа	НАД · Н ₂ + окисленный липоамид = НАД + восстановленный липоамид
1.6.5. Акцепторами служат хиноны или родственные им соединения			
1.6.5.3	НАД(Ф) · Н ₂ : убихинон-оксидоредуктаза	Убихинонредуктаза	НАД(Ф) · Н ₂ + убихинон = = НАД(Ф) + дигидроубихинон
1.6.5.4	НАД(Ф) · Н ₂ : окисленный аскорбат-оксидоредуктаза	Дегидроаскорбатредуктаза	НАД(Ф) · Н ₂ + окисленный аскорбат = НАД(Ф) + аскорбат
1.6.99 Используют другие акцепторы			
1.6.99.1	НАДФ · Н ₂ : (акцептор)-оксидоредуктаза	НАДФ-диафараза	НАДФ · Н ₂ + акцептор = = НАДФ + восстановленный акцептор

1.8. Действуют на серусодержащие группы доноров

1.8.4 Акцептором служит дисульфидное соединение			
1.8.4.1	Глутатион: гомоцистин-оксидоредуктаза	Глутатион-гомоцистин-трансгидрогеназа	2 восстановленный глутатион + гомоцистин = окисленный глутатион + + 2 гомоцистеин

1.9. Действуют на группы гема доноров

1.9.3 Акцептором служит О ₂			
1.9.3.1	Цитохром с: О ₂ -оксидоредуктаза	Цитохромоксидаза	4 ферроцитохром с + О ₂ = = 4 феррицитохром с + + 2Н ₂ О

1.10. Действуют на дифенолы и родственные им соединения в качестве доноров

1.10.3 Акцептором служит О ₂			
1.10.3.1	о-дифенол: О ₂ -оксидоредуктаза	Катехолоксидаза	2 о-дифенол + О ₂ = 2 о-хинон + 2Н ₂ О

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
--------------	--------------------------	--------------------------------	---------

1.11. Действуют на H_2O_2 в качестве акцептора

1.11.1.6	H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза	Каталаза	$H_2O_2 + H_2O_2 = O_2 + 2H_2O$
1.11.1.7	Донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза	Пероксидаза	Донор + H_2O_2 = окисленный донор + $2H_2O$
1.11.1.8	Йодид: H_2O_2 -оксидоредуктаза	Йодид-пероксидаза; йодиназа	Йодид + H_2O_2 = йод + $2H_2O$

1.99. Прочие ферменты, использующие O_2 в качестве окислителя

Природа реакций еще не совсем ясна; рекомендаций по систематическим наименованиям не дается (дополн. перев.)

1.99.1 Гидроксилазы

1.99.1.2	Фенилаланин-4-гидроксилаза	Гидроксилирует L-фенилаланин в L-тирозин; в реакции участвуют НАДФ· H_2 , а также два белка и производные фолиевой кислоты
1.99.1.4	Триптофан-5-гидроксилаза	Гидроксилирует L-триптофан в 5-окситриптофан
1.99.1.7	Стероид-11- β -гидроксилаза	Гидроксилирует стероиды в 11- β -оксистероиды. Одним из участников реакции является НАДФ· H_2
1.99.1.9	Стероид-17- α -гидроксилаза	Гидроксилирует стероиды в 17- α -оксистероиды; одним из участников реакции является НАДФ· H_2
1.99.1.14	p-оксифенилпируват-гидроксилаза	Превращает p-оксифенилпируват в гомогентизиновую кислоту + CO_2

1.99.2 Оксигеназы

1.99.2.1	Липоксигеназа	Ненасыщенный жир + O_2 = пероксид ненасыщенного жира
1.99.2.5	Гомогентизат-оксигеназа	Гомогентизат + O_2 = 4-малеил-ацетоацетат

2. ТРАНСФЕРАЗЫ

2.1. Переносят одноуглеродные остатки

2.1.1 Метилтрансферазы

(В тривиальных названиях вместо „метилтрансфераза“ допустимо обозначение „трансметилаза“ (дополн. перев.)

2.1.1.1	S-аденозилметионин: никотинамид-метилтрансфераза	Никотинамид-метилтрансфераза	S-аденозилметионин + никотинамид = S-аденозилгомоцистеин + N-метилникотинамид
---------	--	------------------------------	---

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
2.1.1.2	S-аденозилметионин: гуанидинацетат-метилтрансфераза	Гуанидинацетатметилтрансфераза	S-аденозилметионин + гуанидинацетат = S-аденозилгомоцистеин + креатин
<p>2.1.2 Трансферазы оксиметильных, формильных и родственных групп (В тривиальных названиях вместо „оксиметилтрансфераза“, „формилтрансфераза“, „формиминотрансфераза“ допустимы обозначения „трансоксиметилаза“, „трансформилаза“, „трансформиминаза“) (дополн. перев.)</p>			
2.1.2.1	L-серин: тетрагидрофолят-10-оксиметилтрансфераза	Серин-оксиметилтрансфераза	L-серин + тетрагидрофолят = глицин + 10-оксиметилтетрагидрофолят
2.1.2.4	N-формиминоглицин: тетрагидрофолят-5-формиминотрансфераза	Глицин-формиминотрансфераза	N-формиминоглицин + тетрагидрофолят = глицин + 5-формиминотетрагидрофолят
<p>2.1.3 Карбоксил- и карбамоилтрансферазы (В тривиальных названиях вместо „карбоксилтрансфераза“ и „карбамоилтрансфераза“ допустимы обозначения „транскарбоксилаза“, „транскарбамоилаза“) (дополн. перев.)</p>			
2.1.3.3	Карбамоилфосфат: L-орнитин-карбамоилтрансфераза	Орнитин-карбамоилтрансфераза	Карбамоилфосфат + L-орнитин = ортофосфат + L-цитруллин

2.2. Переносят альдегидные или кетонные остатки

2.2.1.1	D-седогептулозо-7-фосфат: D-глицеральдегид-3-фосфат-гликольальдегидтрансфераза	Транскетолаза; гликольальдегидтрансфераза	D-седогептулозо-7-фосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат = D-рибозо-5-фосфат + D-ксилулозо-5-фосфат
2.2.1.2	D-седогептулозо-7-фосфат: D-глицеральдегид-3-фосфат-диоксиацетонтрансфераза	Трансальдолаза; диоксиацетонтрансфераза	D-седогептулозо-7-фосфат + D-глицеральдегид-3-фосфат = D-эритрозо-4-фосфат + D-фруктозо-6-фосфат

2.3. Переносят ацильные остатки

2.3.1 Ацилтрансферазы

(В тривиальных названиях вместо „ацетилтрансфераза“ и т.п. допустимы обозначения „трансацетилаза“ и т.п.) (дополн. перев.)

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
2.3.1.6	Ацетил-КоА: холин-О-ацетилтрансфераза	Холин-ацетилтрансфераза	Ацетил-КоА + холин = = КоА + О-ацетилхолин
2.3.1.15	Ацил-КоА: L-глицерол-3-фосфат-ацилтрансфераза	Глицерофосфатацилтрансфераза	Ацил-КоА + L-глицерол-3-фосфат = КоА + моноглицерид-фосфат

2.4. Переносят гликозильные остатки

В тривиальных названиях вместо „глюкозилтрансфераза“, „фруктозилтрансфераза“ и т.д. допустимы обозначения „трансглюкозилаза“, „трансфруктозилаза“ и т.п. (дополн. перев.)

2.4.1 Гексозилтрансферазы			
2.4.1.1	α -1,4-глюкан: ортофосфат-глюкозилтрансфераза	α -глюканфосфорилаза	$(\alpha\text{-}1,4\text{-глюкозил})_n + \text{ортофосфат} = (\alpha\text{-}1,4\text{-глюкозил})_{n-1} + \alpha\text{-D-глюкозо-}1\text{-фосфат}$
2.4.1.11	УДФ глюкоза: α -1,4-глюкан- α -4-глюкозилтрансфераза	УДФглюкоза- α -глюкан-глюкозилтрансфераза; α -глюкан-УДФ-глюкозилтрансфераза	УДФ глюкоза + $(\alpha\text{-}1,4\text{-глюкозил})_n = \text{УДФ} + (\alpha\text{-}1,4\text{-глюкозил})_{n+1}$
2.4.1.17	УДФ глюкуронат-глюкуронилтрансфераза (неспецифичная к акцептору)	УДФ-глюкуронилтрансфераза	УДФ глюкуронат + акцептор = УДФ + акцептор-глюкуронат
2.4.2 Пентозилтрансферазы			
2.4.2.1	Пуриннуклеозид: ортофосфат-рибозилтрансфераза	Пуриннуклеозидфосфорилаза	Пуриннуклеозид + ортофосфат = α -D-рибозо-1-фосфат + пурин
2.4.2.11	Никотинатнуклеотид: пиррофосфат-фосфорибозилтрансфераза	Никотинат-фосфорибозилтрансфераза	Никотинатрибонуклеотид + пиррофосфат = никотинат + 5-фосфо- α -D-рибозилпиррофосфат
2.4.2.13	АТФ: L-метионин-S-аденозилтрансфераза	Метионин-аденозилтрансфераза	АТФ + L-метионин + H_2O = ортофосфат + пиррофосфат + S-аденозилметионин

2.6. Переносят азотистые группы

2.6.1 Аминотрансферазы (В тривиальных названиях вместо „аминотрансфераза“ допустимо обозначение „трансаминаза“) (дополн. перев.)			
2.6.1.1	L-аспартат: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза	Аспартат-аминотрансфераза	L-аспартат + 2-оксоглутарат = оксалоацетат + L-глутамат
2.6.1.2	L-аланин: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза	Аланин-аминотрансфераза	L-аланин + 2-оксоглутарат = пируват + L-глутамат
2.6.1.3	L-цистеин: 2-оксоглутарат-аминотрансфераза	Цистеин-аминотрансфераза	L-цистеин + 2-оксоглутарат = 3-меркаптопируват + L-глутамат

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
2.6.2 Амидинотрансферазы (В тривиальных названиях вместо „амидинотранс- фераза“ допустимо обозначение „трансамидиназа“) (дополн. перев.)			
2.6.2.1	L-аргинин: глицин-ами- динотрансфераза	Глицин-амидинотранс- фераза	L-аргинин + глицин = = L-орнитин + гуанидин- -ацетат

2.7. Переносят группы, содержащие фосфор

2.7.1 Фосфотрансферазы со спиртовой группой в роли акцептора			
2.7.1.1	АТФ: D-гексоза-6-фос- фотрансфераза	Гексокиназа	АТФ + D-гексоза = = АДФ + D-гексозо-6- -фосфат
2.7.1.2	АТФ: D-глюкоза-6-фос- фотрансфераза	Глюкокиназа	АТФ + D-глюкоза = = АДФ + D-фруктозо-6- -фосфат
2.7.1.3	АТФ: D-фруктоза-1-фос- фотрансфераза	Кетогексокиназа	АТФ + D-фруктоза = = АДФ + D-фруктозо-1- -фосфат
2.7.1.4	АТФ: D-фруктоза-6-фос- фотрансфераза	Фруктокиназа	АТФ + D-фруктоза = = АДФ + D-фруктозо-6- -фосфат
2.7.1.11	АТФ: D-фруктозо-6- -фосфат-1-фосфотранс- фераза	Фосфофруктокиназа	АТФ + D-фруктозо-6-фо- сфат = АДФ + D-фрук- тозо-1,6-дифосфат
2.7.1.23	АТФ: НАД-2'-фосфо- трансфераза	НАД-киназа	АТФ + НАД = АДФ + + НАДФ
2.7.1.30	АТФ: глицерол-фосфо- трансфераза	Глицеролкиназа	АТФ + глицерин = = АДФ + L-глицеро-3- -фосфат
2.7.1.31	АТФ: D-глицерат-3-фос- фотрансфераза	Глицераткиназа	АТФ + D-глицерат = = АДФ + 3-фосфо-D- -глицерат
2.7.1.40	АТФ: пируват-фосфо- трансфераза	Пируваткиназа	АТФ + пируват = АДФ + + фосфоенолпируват
2.7.2 Фосфотрансферазы с карбоксильной группой в роли акцептора			
2.7.2.3	АТФ: D-3-фосфоглице- рат-1-фосфотрансфераза	Фосфоглицераткиназа	АТФ + D-3-фосфоглице- рат = АДФ + 1,3-дифос- фат D-глицериновой ки- слоты
2.7.3 Фосфотрансферазы с азотистой группой в роли акцептора			
2.7.3.2	АТФ: креатин-фосфо- трансфераза	Креатинкиназа	АТФ + креатин = АДФ + + фосфокреатин
2.7.4 Фосфотрансферазы с фосфатной группой в роли акцептора			

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
2.7.4.3	АТФ:АМФ-фосфотранс- фераза	Аденилаткиназа	АТФ + АМФ = АДФ + +АДФ
2.7.5 Фосфотрансферазы с внутримолекулярным переносом (с регенерацией донора)			
2.7.5.1	D-глюкозо-1,6-дифос- фат: D-глюкозо-1-фос- фотрансфераза	Фосфоглюкомутаза; глю- козофосфомутаза	D-глюкозо-1,6-дифос- фат + D-глюкозо-1-фос- фат = D-глюкозо-6-фос- фат + D-глюкозо-1,6-ди- фосфат
2.7.5.3	D-2,3-дифосфоглицерат: D-2-фосфоглицерат-фос- фотрансфераза	Фосфоглицератмутаза; глицерат-фосфомутаза	D-2,3-дифосфоглицерат + + D-2-фосфоглицерат = = D-3-фосфоглицерат + + D-2,3-дифосфоглице- рат
2.7.6 Пирофосфотрансферазы			
2.7.6.1	АТФ: D-рибозо-5-фос- фат-пирофосфотрансфе- раза	Рибозофосфат-пирофос- фокиназа	АТФ + D-рибозо-5-фос- фат = АМФ + 5-фосфо- -α-D-рибозил-пирофос- фат
2.7.7 Нуклеотидилтрансферазы			
2.7.7.6	Нуклеозидтрифосфат: :РНК-нуклеотидилтранс- фераза	РНК-нуклеотидилтранс- фераза	4 нуклеозидтрифосфат + + (РНК) _n = 4 пирофос- фат + (РНК) _{n+4}
2.7.7.12	УДФ-глюкоза: α-D-гала- ктозо-1-фосфат-ури- дилитрансфераза	Гексозо-1-фосфат-уриди- литрансфераза	УДФ-глюкоза + α-D-га- лактозо-1-фосфат = α-D- -глюкозо-1-фосфат + + УДФ-галактоза
2.7.7.16	[Полирибонуклеотид-2- -олигонуклеотидотранс- фераза (циклизующая дополн. перев.)]	Рибонуклеаза	Переносит 3'-фосфат пи- римидиннуклеотидного остатка полинуклеотидов от положения 5' соседне- го нуклеотида на поло- жение 2' самого пирами- динового нуклеотида, с образованием цикличе- ского 2',3'-нуклеотида
2.7.8 Переносят другие замещенные фосфатные группировки			
2.7.8.1	ЦДФ этаноламин: 1,2- -диглицерид-этанол- аминфосфотрансфераза	Этаноламинфосфотранс- фераза	ЦДФ-этаноламин + 1,2- диглицерид = ЦМФ + + фосфатидилэтаноламин
2.7.8.2	ЦДФ холин: 1,2-дигли- церид-холинфосфотранс- фераза	Холинфосфотрансфераза	ЦДФ-холин + 1,2-дигли- церид = ЦМФ + фосфа- тидилхолин

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
-----------------	-----------------------------	-----------------------------------	---------

2.8. Переносят группы, содержащие серу

2.8.1 Сульфидтрансферазы			
2.8.1.1	Тиосульфат: цианид- сульфидтрансфераза	Тиосульфат-сульфид- трансфераза	Тиосульфат + цианид = = сульфит + роданид
2.8.2 Сульфотрансферазы			
2.8.2.1	3'-фосфоаденилил-суль- фат: фенол-сульфотранс- фераза	Арилсульфотрансфераза	3'-фосфоаденилилсуль- фат + фенол = аденозин- -3',5'-дифосфат + арил- серный эфир
2.8.3 КоА-трансферазы			
2.8.3.3	Ацетил-КоА: малонат- КоА-трансфераза	Малонат-КоА-трансфе- раза	Ацетил-КоА + малонат = ацетат + малонил-КоА

3. ГИДРОЛАЗЫ

3.1. Действуют на сложноэфирные связи

3.1.1 Гидролазы эфиров карбоновых кислот

3.1.1.1	Гидролаза эфиров кар- боновых кислот	Карбоксилэстераза; али- эстераза	Эфир карбоновой кисло- ты + H_2O = спирт + кар- боновая кислота
3.1.1.3	Гидролаза эфиров гли- церина	Липаза	Триглицерид + H_2O = ди- глицерид + жирная кис- лота
3.1.1.4	Ацилгидролаза фосфати- дов	Фосфолипаза А	Лецитин + H_2O = лизоле- цитин + ненасыщенная жирная кислота
3.1.1.5	Ацилгидролаза лизолеци- тина	Лизофосфолипаза; фос- фолипаза В	Лизолецитин + H_2O = = глицерофосфохолин + + жирная кислота
3.1.1.7	Ацетилгидролаза ацетил- холина	Ацетилхолинэстераза	Ацетилхолин + H_2O = хо- лин + уксусная кислота
3.1.1.8	Ацилгидролаза ацилхоли- нов	Холинэстераза	Ацилхолин + H_2O = хо- лин + кислота
3.1.1.13	Гидролаза стероловых эфиров	Холестеролэстераза	Эфир холестерина + H_2O = = холестерол + кислота

3.1.2 Гидролазы тиоловых эфиров

3.1.2.1	Ацетил-КоА-гидролаза	Ацетил-КоА-гидролаза	Ацетил-КоА + H_2O = = КоА + уксусная кислота
---------	----------------------	----------------------	---

3.1.3 Гидролазы фосфомоноэфиров

3.1.3.1	Фосфогидролаза моно- эфиров ортофосфата	Щелочная фосфатаза (фосфомоноэстераза)	Моноэфир ортофосфа- та + H_2O = спирт + H_3PO_4
3.1.3.2	Фосфогидролаза моно- эфиров ортофосфата	Кислая фосфатаза (фос- фомоноэстераза)	Моноэфир ортофосфата + + H_2O = спирт + H_3PO_4
3.1.3.5	5'-рибонуклеотид-фос- фогидролаза	5-нуклеотидаза	5'-рибонуклеотид + H_2O = = рибонуклеозид + + H_3PO_4

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
3.1.3.9	D-глюкозо-6-фосфат-фосфогидролаза	Глюкозо-6-фосфатаза	D-глюкозо-6-фосфат + H_2O = D-глюкоза + ортофосфат
3.1.3.17	Фосфогидролаза фосфорилазы а	Фосфатаза - фосфорилазы а	Фосфорилаза а + $4H_2O$ = 2 = фосфорилаза b + $4H_3PO_4$
3.1.4 Гидролазы фосфодиэфиров			
3.1.4.1	Фосфогидролаза ортофосфорных диэфиров	Фосфодиэстераза	Ортофосфорный диэфир + H_2O = фосфорный моноэфир + спирт
3.1.4.3	Фосфатидилхолин-холинфосфогидролаза	Фосфолипаза С	Фосфатидилхолин + H_2O = 1,2-диглицерид + холинфосфат
3.1.4.4	Фосфатидилхолин-фосфатидогидролаза	Фосфолипаза D	Фосфатидилхолин + H_2O = холин + фосфатидная кислота
3.1.4.5	Олигонуклеотидогидролаза дезоксирибонуклеиновых кислот	Дезоксирибонуклеаза	ДНК + $(n-1)H_2O$ = n олигодезоксирибонуклеотидов
3.1.6 Гидролазы сульфозэфиров			
3.1.6.1	Арилсульфат-сульфогидролаза	Арилсульфатаза	Фенолсерный эфир + H_2O = фенол + H_2SO_4

3.2. Действуют на гликозильные соединения

3.2.1 Гидролазы гликозидов			
3.2.1.1	α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза	α -амилаза	Гидролизует α -1,4-глюкановые связи в полисахаридах, содержащих три или более соединенных α -1,4-связями
3.2.1.2	α -1,4-глюкан-мальтогидролаза	β -амилаза	Гидролизует α -1,4-глюкановые связи в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки мальтозы от нередуцирующих концов цепей
3.2.1.3	α -1,4-глюкан-глюкогидролаза	Глюкоамилаза	Гидролизует α -1,4-глюкановые связи в полисахаридах, последовательно отщепляя остатки глюкозы от нередуцирующих концов цепей
3.2.1.9	Амил-6-глюканогидролаза	Амил-1,6-глюкозидаза	Гидролизует α -1,6-глюкановые связи в амилопектине и гликогене
3.2.1.17	N-ацетилмурамид-глюканогидролаза	Мурамидаза	Вероятно гидролизует β -1,4-связи между остатками N-ацетилмураминовой кислоты и 2-ацетиламино-2-дезокси-D-глюкозы в мукополисахаридах и мукопептидах

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
3.2.1.19	Гепарин-глюканогидро- лаза	Гепариназа	Гидролизует α -1,4-связи между остатками 2-ами- но-2-дезоксид- <i>D</i> -глюкозы и <i>D</i> -глюкуроновой кисло- ты
3.2.1.21	β - <i>D</i> -глюкозид-глюкогид- ролаза	β -глюкозидаза	β - <i>D</i> -глюкозид + H_2O = = спирт + <i>D</i> -глюкоза
3.2.1.26	β - <i>D</i> -фруктофуранозид- фруктогидролаза	β -фруктофуранозидаза	β - <i>D</i> -фруктофуранозид + + H_2O = спирт + <i>D</i> -фрук- тоза
3.2.1.31	β - <i>D</i> -глюкуронид-глюку- роногидролаза	β -глюкуронидаза	β - <i>D</i> -глюкуронид + H_2O = = спирт + <i>D</i> -глюкуроно- вая кислота
3.2.2 Гидролазы N-гликозильных соединений			
3.2.2.1	N-рибозилшурин-рибо- гидролаза	Нуклеозидаза	N-рибозилшурин + H_2O = = пуриновое основание + <i>D</i> -рибоза

3.3. Действуют на эфирные связи

3.3.1 Гидролазы тиоэфиров			
3.3.1.1	S-аденозил-L-гомоци- стеин-гидролаза	Аденозилгомоцистеиназа	S-аденозил-L-гомоцисте- ин + H_2O = аденозин + L- гомоцистеин

3.4. Действуют на пептидные связи (пептид-гидролазы)

3.4.1 α -аминопептид-аминоацидогидролазы			
3.4.1.1		Лейцинаминопептидаза	Гидролизует L-пептиды, отщепляя N-концевые о- статки со свободной α - аминогруппой, особенно если N-концевой остаток принадлежит лейцину или родственной ему ами- нокислоте
3.4.1.2		Аминопептидаза	Гидролизует дипептиды и трипептиды, отщепляя N-концевой остаток
3.4.2 α -карбоксипептид-аминоацидогидролазы			
3.4.2.1		Карбоксипептидаза А	Гидролизует пептиды с отщеплением C-концево- го L-аминокислотного о- статка, если таковым яв- ляется остаток пролина или диаминокислоты
3.4.2.2		Карбоксипептидаза В (ра- нее протаминаза)	Гидролизует пептиды с C-концевым остатком ли- зина или аргинина, от- щепляя этот остаток
3.4.3 Дипептигидролазы			

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
3.4.3.1	Глицилглицин-гидролаза	Глицилглицин-дипепти- даза	Гидролизует глицилгли- цин и саркозилглицин
3.4.4 Пептид-пептидогидролазы			
3.4.4.1		Пепсин	Гидролизует пептиды, о- собенно по связям, при- лежающим к остаткам аро- матических или дикарбо- новых L-аминокислот
3.4.4.3		Реннин; сычужный фер- мент	Гидролизует пептиды; по специфичности, возмож- но, аналогичен ферменту 3.4.4.1
3.4.4.4		Трипсин	Гидролизует пептиды, а- миды, сложные эфиры и т. п. по месту связей, в которых участвуют кар- боксильные группы L- аргинина или L-лизина
3.4.4.5		Химотрипсин	Гидролизует пептиды, амиды, сложные эфиры и т. д., особенно по месту связей, в которых уча- ствуют карбоксильные группы ароматических L-аминокислот
3.4.4.7		Панкреатопептидаза Е (ранее эластаза)	Гидролизует пептиды преимущественно по свя- зям, прилежающим к ос- ткам нейтральных ами- нокислот
3.4.4.8		Энтеропептидаза (ранее энтерокиназа)	Гидролизует пептиды; превращает трипсиноген в трипсин
3.4.4.9		Катепсин С	Гидролизует пептиды, о- собенно по связям, содер- жащим ароматическую а- минокислоту, смежную со свободной α -аминогруп- пой
3.4.4.10		Папаин	Гидролизует пептиды, а- миды и сложные эфиры, особенно по связям, в ко- торых участвуют диами- нокислоты, лейцин или глицин
3.4.4.13		Тромбин	Гидролизует пептиды, а- миды и сложные эфиры L-аргинина; превращает фибриноген в фибрин
3.4.4.14		Плазмин	Гидролизует пептиды и сложные эфиры L-арги- нина и L-лизина; превра- щает фибрин в раствори- мые продукты

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
3.4.4.15		Ренин	Превращает гипертенсиген в гипертенсин
3.4.4.19		Клостридиопептидаза А (ранее коллагеназа)	Гидролизует пептиды, содержащие пролин, в том числе коллаген желатину

3.5. Действует на С—N связи, отличающиеся от пептидных связей

3.5.1 В линейных амидах			
3.5.1.1	L-аспарагин-амидогидролаза	Аспарагиназа	$L\text{-аспарагин} + H_2O = L\text{-аспартат} + NH_3$
3.5.1.2	L-глутамин-амидогидролаза	Глутаминаза	$L\text{-глутамин} + H_2O = L\text{-глутамат} + NH_3$
3.5.1.5	Карбамид-амидогидролаза	Уреаза	$Мочевина + H_2O = CO_2 + 2NH_3$
3.5.2 В циклических амидах			
3.5.2.6	Пенициллин-амидогидролаза	Пенициллиназа	$Пенициллин + H_2O = \text{пенициллиновая кислота}$
3.5.3 В линейных амидинах			
3.5.3.1	L-аргинин-уреогидролаза	Аргиназа	$L\text{-аргинин} + H_2O = L\text{-орнитин} + \text{мочевина}$
3.5.4 В циклических амидинах			
3.5.4.2	Аденин-аминогидролаза	Адениндезаминаза	$Аденин + H_2O = \text{гипоксантин} + NH_3$
3.5.4.6	АМФ-аминогидролаза	АМФдезаминаза	$АМФ + H_2O = ИМФ + NH_3$

3.6. Действуют на кислотноангидридные связи

3.6.1 В фосфорилсодержащих ангидридах			
3.6.1.1	Пирофосфат-фосфогидролаза	Неорганическая пирофосфатаза	$Пирофосфат + H_2O = 2 \text{ ортофосфат}$
3.6.1.3	АТФ-фосфогидролаза	АТФаза	$АТФ + H_2O = АДФ + \text{ортофосфат}$
3.6.1.8	АТФ-пирофосфогидролаза	АТФаза	$АТФ + H_2O = АМФ + \text{пирофосфат}$
3.6.1.9	Динуклеотид-нуклеотидогидролаза	Нуклеотид-пирофосфатаза	$Динуклеотид + H_2O = \text{два нуклеотида}$

3.9. Действуют на Р—N связи

3.9.1.1	Фосфоамид-гидролаза	Фосфоамидаза	$Фосфокреатин + H_2O = \text{креатин} + \text{ортофосфат}$
---------	---------------------	--------------	--

4. ЛИАЗЫ

4.1. Углерод-углерод-лиазы (С—С-лиазы)

4.1.1 Карбокси-лиазы			
4.1.1.1	Карбокси-лиаза 2-оксокислоты (α -кетокислоты)	Пируватдекарбоксилаза	$2\text{-оксокислота} = \text{альдегид} + CO_2$

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
4.1.1.15	L-глутамат-1-карбокси-лиаза	Глутаматдекарбоксилаза	L-глутамат = 4-аминобутират + CO ₂
4.1.1.25	L-тирозин-карбоксилиаза	Тирозиндекарбоксилаза	L-тирозин = тирамин + CO ₂
4.1.2 Альдегид-лиазы			
4.1.2.6	L-аллотреонин-ацетальдегид-лиаза	Аллотреонинальдолаза	L-аллотреонин = глицин + ацетальдегид
4.1.2.7	Кетозо-1-фосфат-альдегид-лиаза	Альдолаза	Кетозо-1-фосфат = диоксиацетонфосфат + альдегид
4.1.3 Лиазы кетокислот			
4.1.3.7	Цитрат-оксалоацетат-лиаза (ацетилирующая КоА)	Цитрат-синтетаза (ранее „цитрат-конденсирующий фермент“)	Цитрат + КоА = ацетил-КоА + H ₂ O + оксалоацетат

4.2. Углерод-кислород-лиазы (C—O-лиазы)

4.2.1 Гидролиазы			
4.2.1.1	Карбонат-гидро-лиаза	Карбонат-дегидратаза; карбоангидраза	H ₂ CO ₃ = CO ₂ + H ₂ O
4.2.1.2	L-малат-гидро-лиаза	Фумаратгидратаза	L-малат = фумарат + H ₂ O
4.2.1.3	Цитрат (изоцитрат)-гидро-лиаза	Аконитатгидраза	Цитрат = цис-аконитат + H ₂ O
4.2.1.11	D-2-фосфоглицерат-гидро-лиаза	Фосфопироват-гидратаза	D-2-фосфоглицерат = фосфоенолпироват + H ₂ O
4.2.1.13	L-серин-гидро-лиаза (дезаминирующая)	L-серингидратаза	L-серин + H ₂ O = пироват + NH ₃ + H ₂ O
4.2.99 Прочие углерод-кислород-лиазы			
4.2.99.1	Гиалуронат-лиаза	Гиалуронат-лиаза	Гиалуронат = п3-(β-D-глюко-3,4-ен-уроно)-2-ацетиламино-2-дезоксид-D-глюкоза

4.3. Углерод-азот-лиазы (C—N-лиазы)

4.3.1 Аммиак-лиазы			
4.3.1.1	L-аспартат-аммиак-лиаза	Аспартат-аммиак-лиаза (ранее аспартаза)	L-аспартат = фумарат + NH ₃
4.3.1.3	L-гистидин-аммиак-лиаза	Гистидин-аммиак-лиаза (ранее гистидин-α-дезаминаза)	L-гистидин = уроканиновая кислота + NH ₃

4.4. Лиазы углерод-серы (C—S-лиазы)

4.4.1.1	L-цистеин-сероводород-лиаза (дезаминирующая)	Цистеиндесульфгидраза	L-цистеин + H ₂ O = пироват + NH ₃ + H ₂ S
---------	--	-----------------------	---

5. ИЗОМЕРАЗЫ

5.1. Рацемазы и эпимеразы

5.1.1 Действуют на аминокислоты и их производные			
5.1.1.1	Аланинрацемаза	Аланинрацемаза	L-аланин = D-аланин

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
5.1.1.6	Треонинрацемаза	Треонинрацемаза	L-треонин = D-треонин
5.1.3 Действуют на углеводы и их производные			
5.1.3.1	D-рибулозо-5-фосфат-3-эпимераза	Рибулозофосфатэпимераза	D-рибулозо-5-фосфат = D-ксилулозо-5-фосфат
5.1.3.2	УДФ глюкозо-4-эпимераза	УДФ глюкозо-эпимераза	УДФ глюкоза = УДФ галактоза

5.2. Цис-транс-изомеразы

5.2.1.1	Малеинат-цис-транс-изомераза	Малеинат-изомераза	Малеинат = фумарат
---------	------------------------------	--------------------	--------------------

5.3. Внутримолекулярные оксидоредуктазы

5.3.1 Катализируют взаимопревращение альдоз и кетоз			
5.3.1.1	D-глицеральдегид-3-фосфат-кетол-изомераза	Триозофосфат-изомераза	D-глицеральдегид-3-фосфат = диоксиацетонфосфат
5.3.1.9	D-глюкозо-6-фосфат-кетол-изомераза	Глюкозофосфатизомераз	D-глюкозо-6-фосфат = D-фруктозо-6-фосфат

5.4. Внутримолекулярные трансферазы

5.4.2 Переносят фосфорильные группы			
5.4.2.1	D-фосфоглицерат-2,3-фосфомутаза	Фосфоглицерат-фосфомутаза	2-фосфо-D-глицерат = 3-фосфо-D-глицерат

6. ЛИГАЗЫ

6.1. Образуют C—O связи

6.1.1 Лигазы аминокислот-РНК			
6.1.1.1	L-тирозин: sРНК-лигаза (АМФ)	Тирозил-sРНК-синтетаза	АТФ + L-тирозин + sРНК = АМФ + пиррофосфат + L-тирозил-sРНК

6.2. Образуют C—S связи

6.2.1 Кислото-тиоловые лигазы			
6.2.1.1	Ацетат: КоА-лигаза (АМФ)	Ацетил-КоА-синтетаза	АТФ + ацетат + КоА = АМФ + пиррофосфат + ацетил-КоА
6.2.1.2	Кислота: КоА-лигаза (АМФ)	Ацил-КоА-синтетаза	АТФ + карбоновая кислота + КоА = АМФ + пиррофосфат + ацил-КоА
6.2.1.4	Сукцинат: КоА-лигаза (ГДФ)	Сукцинил-КоА-синтетаза	ГТФ + сукцинат + КоА = ГДФ + ортофосфат + сукцинил-КоА

Номер (шифр)	Систематическое название	Тривиальное (рабочее) название	Реакция
--------------	--------------------------	--------------------------------	---------

6.3. Образуют C—N связи

6.3.1 Кислотно-аммиачные лигазы (амидсинтетазы)			
6.3.2.2	L-глутамат: L-цистеин-γ-лигаза (АДФ)	γ-глутамилцистеинсинтетаза	АТФ + L-глутамат + L-цистеин = АДФ + ортофосфат + γ-L-глутамил-L-цистеин
6.3.2.3	γ-L-глутамил-L-цистеин: глицин-лигаза (АДФ)	Глутатионсинтетаза	АТФ + γ-L-глутамил-L-цистеин + глицин = АДФ + ортофосфат + восстановленный глутатион

6.4. Образуют C—C связи

6.4.1.1	Пируват: CO ₂ -лигаза (АДФ)	Пируваткарбоксилаза	АТФ + пируват + CO ₂ = АДФ + ортофосфат + оксалоацетат
6.4.1.2	Ацетил-КоА: CO ₂ -лигаза (АДФ)	Ацетил-КоА-карбоксилаза	АТФ + ацетил-КоА + CO ₂ = АДФ + ортофосфат + малонил-КоА

Ферменты разделяются на шесть главных классов, из которых каждый подразделен на известное количество подклассов, а те в свою очередь на подподклассы, согласно характеру катализируемой реакции. Каждый фермент обозначен шифром, состоящим из 4 чисел, разделенных точками. Первое число определяет главный класс, второе — подкласс, третье — под-подкласс и четвертое — номер фермента в пределах под-подкласса.

Главные классы:

1. Оксидоредуктазы
2. Трансферазы
3. Гидролазы
4. Лиазы
5. Изомеразы
6. Лигазы (синтетазы).

Оксидоредуктазы катализируют реакции окисления и восстановления, трансферазы — реакции переноса химических групп, гидролазы — реакции гидролиза, лиазы — реакции отщепления химических групп с оставлением двойной связи. Противоположностью этой реакции является присоединение групп к двойной связи. Лигазы или синтетазы катализируют реакцию соединения двух молекул, сопряженную с распадом высокоэнергетических трифосфатов.

Подклассы ближе характеризуют род химической группы, принимающей участие в катализируемой реакции. У оксидоредуктаз он указывает тип группы в доноре, которая подвергается окислению (например — СНОН, альдегидная, кетонная и т.д.). У трансфераз число подкласса указывает химическую природу группы, подвергаемой переносу (аминная, метильная, гликозильная и т.д.). В классе лиаз подклассы указывают типы связей, соединяющих отрываемые группы с остатком молекулы (аммониевая, карбоксильная и т.д.). У изомераз указывается тип изомеризации (цис-транс, рацемизация и т.д.). У лигаз подкласс относится к типу вновь образуемой связи (C—O, C—N

Третье число означает под-подкласс, т.е. более детальную информацию о катализируемой реакции. У оксидоредуктаз ею отмечается тип активатора участвующего в реакции переноса электронов для каждой группы доноров. У трансфераз оно определяет тип акцептора, у гидролаз — уточняет тип гидролизуемых связей (например фосфатных, сульфатных, тиольных эфиров и т.д.) у лиаз — химическую природу отщепляемой группы.

Четвертое и последнее число представляет порядковый номер фермента в данном подклассе.

Для лучшей ориентировки в классификации и номенклатуре ферментов в списке приводятся ключ нумерации и классификации а также даются примеры ферментов в подклассах и уравнения катализируемых ими реакций, согласно опубликованному и одобренному списку ферментов (61).

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ПРИНЦИП ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ФУНКЦИИ

Многочисленные исследования с кристаллическими ферментами, проведенные за последнее двадцатилетие (88, 89, 90), пролили свет на связь между структурой молекулы ферментов и их каталитической функцией. Особенно много внимания уделялось изучению структуры каталитического центра фермента, в котором происходит стереоспецифическое присоединение и ослабление химической связи, на которую направлено действие фермента.

Современная наука располагает рядом методов, при помощи которых можно распознать или пометить каталитический центр фермента. Прямое мечение активного центра было проведено у фосфоглюкомутазы и фосфоглицератмутазы (91, 92, 93). Во время катализа в этих ферментах образуется ковалентная связь с субстратом, который может быть помечен изотопом. После выделения из гидролизованного комплекса фермент-субстрат пептидов или аминокислот, можно определить, к какой аминокислоте присоединился субстрат. Удалось также пометить активный центр при помощи антагониста субстрата, образующего стойкий комплекс с ферментом, благодаря чему последний выделяется. Примером может послужить соединение эстераз и некоторых протеиназ с диизопропилфторфосфатом (94—98), фактором фосфорилирующим серин в ферменте.

Другой метод идентификации положения активного центра в пептидной цепи представляет алкилирование гистидина бромуксусной кислотой, подобно тому, как это делается при исследовании активности рибонуклеазы. Для определения аминокислот, принимающих участие в ферментативной активности, пользуются их модифицированием, например проводят фотоокисление триптофана, удаление или реконструкцию группы SH, ацетилирование групп OH, гуанидильрование аминогрупп лизина и т.п. После модифицирования аминокислот, при сохраненной пептидной цепи, прослеживают влияние этой операции на каталитическую активность.

Производимые до сих пор исследования привели к следующим обобщениям по отношению к условиям работы каталитического центра. Последние зависят в первую очередь от аминокислот, отделенных не более чем на одну химическую связь от некоторых аминокислот каталитического центра. Koshland (99) называет их контактными аминокислотами. Помимо аминокислот, находящихся в непосредственном контакте с субстратом, имеются и другие, более отдаленные аминокислоты, влияющие на ферментативную активность.

Их называют вспомогательными, и считают, что они определенным образом формируют довольно гибкий каталитический центр.

Некоторые из остальных аминокислот также необходимы для поддержания ферментативной активности. Их химическая модификация уменьшает или ликвидирует активность. Им приписывают роль опоры или фундамента для вспомогательных аминокислот. Наконец некоторые аминокислоты, обладающие электрическими зарядами, имеют отношение к каталитической активности, так как удаление их путем химической модификации влияет на ферментативную активность. Koshland предлагает для них название содействующих.

Первый вопрос, на который следует ответить: сколько аминокислот в исследуемом ферменте необходимо для сохранения полной активности? В настоящее время мы располагаем лишь немногими ферментами, достаточно очищенными

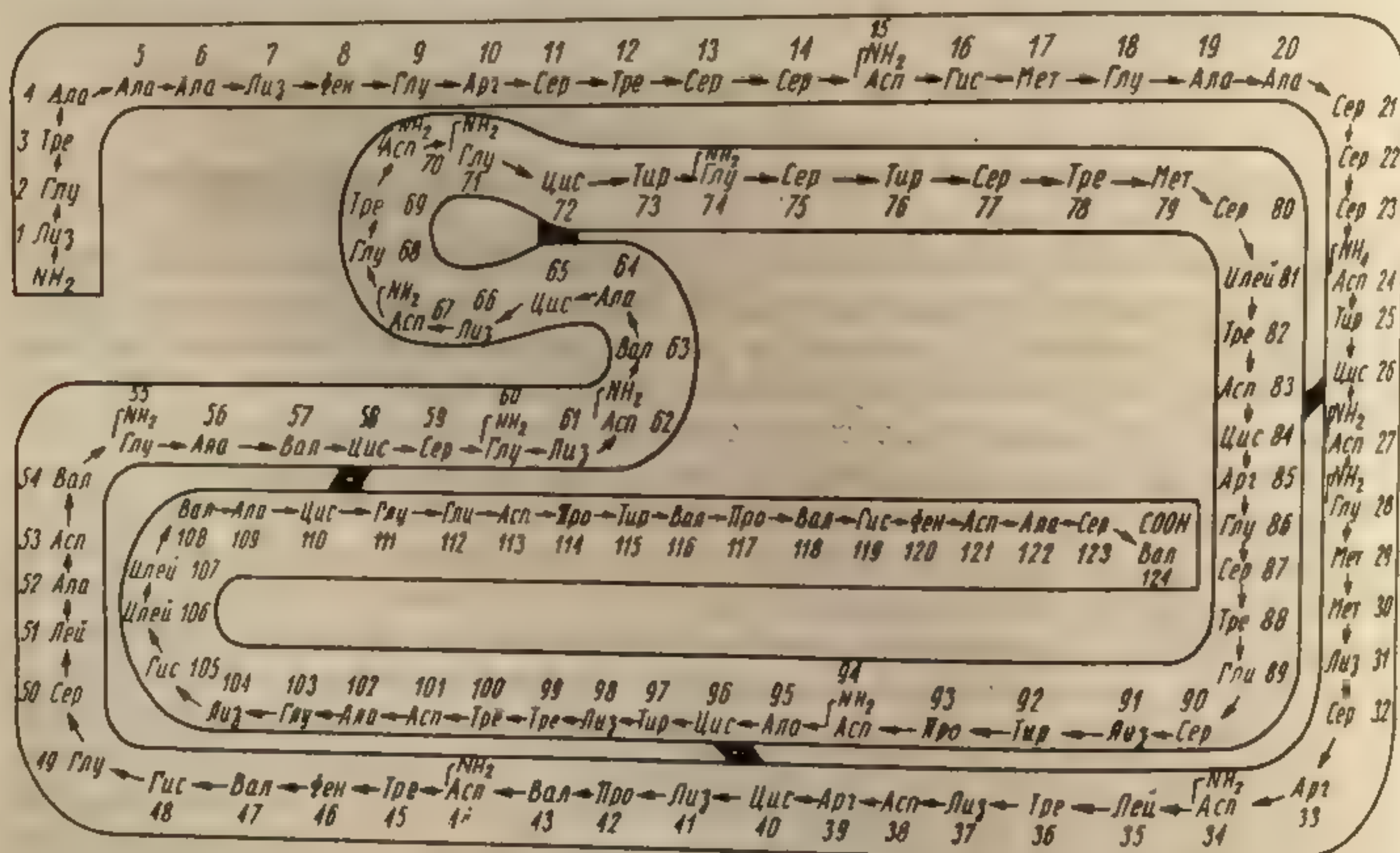


Рис. 23. Первичная структура рибонуклеазы (Moog и Stein, 1961).

для подобных исследований. Воздействием протеолитических ферментов, различных по специфичности, можно отрывать части пептидной цепи или отдельные аминокислоты. Оказалось, что ненужные для ферментативной активности аминокислоты составляют в молекуле папаина $2/3$, в миозине $1/4$, в енолазе $1/5$. Их можно назвать недействующими. Роль этих аминокислот, на сегодняшний день, неясна. Однако известно, что в этой части пептидной цепи имеются генетически обусловленные различия в аминокислотном составе, т.е. видовые различия.

Следующий вопрос относится к строению каталитического центра. Лучше всего исследована связь между молекулярной структурой фермента и ферментативной активностью у рибонуклеазы. Первичная (ковалентная) структура рибонуклеазы схематически изображена в двух измерениях на рис. 23.

Этот фермент, полученный в кристаллическом виде и отличающийся гомогенностью в растворе, состоит только из одной пептидной цепи, содержащей 124 аминокислотных остатка (100, 101, 102). Она содержит 4 мостика S — S образованных парами окисленных остатков цистина. Последствием возникновения этих связей является образование ряда петель в пептидной цепи.

Дисульфидные мостики в рибонуклеазе наряду с пептидными представляют, единственные ковалентные связи. Восстановление переводит фермент в неактивную форму, содержащую 8 групп-SH. Окисление воздухом при pH 7 вызывает возвращение к первичной форме с почти количественной регенерацией активности.

Физико-химические и иммуно-химические тесты показывают тождество нативной и регенерированной рибонуклеазы.

Эти опыты указывают на то, что конформация фермента вытекает из последовательности аминокислот, определяющей вторичную и третичную структуру путем взаимодействия электрических зарядов, находящихся на ионизированных группах, а также при помощи водородных связей.

Можно подействовать на восстановленный фермент концентрированным раствором мочевины, который вызывает разрыв водородных связей и ослабление структуры фермента, а даже выпрямление пептидных спиралей. Инактивированный таким образом фермент можно снова восстановить и регенерировать, при этом наблюдается заново скручивание цепи и возвращение исходных физических и химических свойств.

Путем химической модификации лизиновых остатков, было доказано, что положительные заряды на их ϵ -аминогруппах (в общем 10) необходимы для каталитической активности. Их наличие поблизости каталитического центра понятно, так как субстратом для рибонуклеазы является естественный полианион, рибонуклеиновая кислота.

3 тирозиновых остатка (из общего числа 6) также содействуют фиксации активной структуры фермента, так как инактивация фермента вызывает сдвиг характерной для тирозина полосы поглощения около 278 м μ .

Особую роль в каталитическом центре играет один из гистидиновых остатков (находящийся в положении 119). Алкилирование йодуксусной кислотой этого остатка инактивирует фермент. Подобный же эффект дает фотооксидация этой аминокислоты. Избирательное окисление остатков метионина перекисью водорода при pH 2 в соответствующие сульфоксиды также обуславливает инактивацию фермента, если она проводится у 3 аминокислотных остатков (из 4).

Субтилизин отрывает, путем гидролиза, первые 20 аминокислот со стороны N-концевой группы, что влечет за собой инактивацию фермента. Карбоксипептидаза может удалить последние 3 аминокислоты со стороны концевой C-группы без последствий, зато аспарагиновая кислота в положении 121 необходима.

Аминокислоты в положении 31—41 образуют отрезок, ответственный за присоединение субстрата, который находится в непосредственном соседстве с местом, где происходит активация субстрата.

Как видно, рибонуклеаза представляет тип фермента с особой структурой активного центра. В ней участвует ряд аминокислот, находящихся в разных отрезках пептидной цепи. Необходима большая специфичность конформации, так как ее нарушение вызывает необратимую инактивацию. Также распределение электрических зарядов и „скрывание“ известных аминокислотных остатков от доступа субстрата играет существенную роль в катализе.

Иначе обстоит дело с активностью папаина. Разлагая его аминопептидазой, можно удалить большую часть аминокислот, после чего пептид, состоящий из 75—80 остатков сохраняет полную ферментативную активность. Это пример локализации активного центра на одном отрезке пептидной цепи. Однако, фермент обладает некоторыми свойствами белка, а именно: подвергается термической и поверхностной денатурации, а также инактивируется факторами, изменяющими вторичную структуру, например концентрированным раство-

ром мочевины. Активность небольшого фрагмента фермента связана лишь с одной тиольной группой SH и с одной карбоксильной группой.

У нескольких изученных ферментов, инактивирующихся фторфосфатом, удалось определить последовательность чередования аминокислот в реактивном месте. Если реакция с этим ингибитором инактивирует фермент, то эту последовательность следует считать ответственной за каталитическую активность. Определение пептида, принадлежащего к каталитическому центру, было облегчено тем, что ингибитор был мечен радиоактивным изотопом. 1 моль фермента реагировал с 1 молем ингибитора, в результате чего фермент полностью лишался активности. Оказалось, что все ферменты, на которые ДФФ (диизопропилфторфосфат) производит отравляющее действие, независимо от разнородности ферментативной специфичности, отличаются весьма сходной последовательностью аминокислот в каталитическом центре: -гли-асп-сер-гли- или -гли-глу-сер-ала-.

Наличие общей последовательности чередования аминокислот в активном центре многих ферментов весьма знаменательно и свидетельствует о том, что гидролиз сложных эфиров, катализируемый этими ферментами, протекает одинаково. Остается не выясненным вопрос избирательной специфичности отдельных ферментов по отношению к субстратам.

Весьма высока также реактивность гидроксильной группы серина, что не может быть обусловлено одним только соседством определенных аминокислот в каталитическом центре. Серин является акцептором ацила во время образования ацило-фермента или диизопропилфосфорила при торможении ферментативной активности ингибитором ДФФ. Есть предположение, что неожиданно высокая реактивность гидроксильной группы серина обусловлена ее реакцией с другими группами, расположенными на более отдаленных отрезках пептидной цепи, и приближенными к каталитическому центру вследствие складчатой или спиральной структуры цепи. Главной аминокислотой в этом взаимодействии считают гистидин, и особенно водородную связь с азотом имидазольной группы.

Примером роли металла в ферментативном катализе, является карбокси-пептидаза А, фермент расщепляющий крайнюю связь со стороны аминокислоты со свободной карбоксильной группой. Это белок с массой 34300, содержащий в молекуле один атом цинка. При диализе раствора фермента в присутствии буфера или растворов соединений, комплексующих металлы, происходит пропорциональное потере металла падение активности, вплоть до полной инактивации. Полученный таким образом апофермент реактивируется цинком и другими двухвалентными ионами, как Co, Ni, Mn и Fe. По силе активирования апофермента ионы располагаются в следующем порядке Co, Ni, Zn, Mn, Fe, причем кобальт активирует на 220% а никель на 130% по отношению к цинку.

Активность карбоксипептидазы зависит от присоединения одного атома цинка к одной меркаптидной группе (SH) апокарбоксипептидазы. Если эту группу предварительно блокировать, например п-хлормеркурибензоатом, прибавление цинка не восстанавливает активности апофермента. Группа SH принадлежит к единственному цистеинному остатку, обнаруженному в ферменте. В каталитическом центре участвует кроме того один атом азота, находящийся в одной из α -аминовых групп или в имидазольном ядре гистидина.

Приготовление реактивированной апокарбоксилазы другими металлами дало неожиданный результат. Оказалось, что хотя активность фермента и восстанавливается, но одновременно изменяется его специфичность. Кадмиевый или ртутный металлофермент приобрел эстеразную способность вместо пепти-

Общие выводы, которые можно сделать на основании произведенных до сих пор наблюдений, указывают на необходимость сохранения специфичной конформации, т.е. геометрии молекулы фермента в трех измерениях. Это достигается благодаря связям S—S, водородным, ионным и гидрофобным. Большую роль играет также хелпирование с металлами и стабилизация посредством субстрата.

Пространственная геометрия молекулы фермента обусловлена, как видно, многими факторами, стабилизирующими, и наоборот, разрушающими многочисленные интрамолекулярные связи. Имеются данные, что структура фермента весьма пластична и имеет много термодинамически стойких конформационных вариантов. Значительная часть молекулы фермента может обратимо деформироваться. Это относится также к каталитическому центру, который первоначально деформируется, а впоследствии регенерируется в первоначальной форме.

Такая деформация активного центра происходит, по всей вероятности, во время каталитической деятельности. Ряд наблюдений указывает на необходимость адаптации молекулы субстрата к каталитическому центру, который является ее слепком, в трех измерениях. Интересна гипотеза Koshland (103) согласно которой каталитический центр может изменять конформацию под индуцирующим влиянием молекулы субстрата так, что образуется дополнительная пространственная структура.

ТЕРМОДИНАМИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

Ход реакции возможен при соблюдении двух условий:

- 1) реакция должна быть термодинамически возможна,
- 2) она должна проходить с достаточной скоростью.

Реакция термодинамически возможна, если она сопровождается падением свободной энергии системы, т.е. превращение свободной энергии ΔG является отрицательной величиной. Необходимую скорость реакция приобретает благодаря присутствию биокатализатора или фермента.

Свободная энергия ΔG представляет ту часть внутренней энергии реагирующей системы, которая может быть использована под видом полезной работы. Знак и величина этого термодинамического фактора определяют, произойдет ли реакция и каково будет ее направление. Между превращением свободной энергии и константой химического равновесия имеется следующая зависимость:

$$(1) \quad \Delta G^0 = -RT \ln K$$

В том уравнении K является константой равновесия, ΔG^0 свободной энергией в стандартных состояниях (температура 25°, активность раствора = 1, давление 1 атмосферы), или стандартной свободной энергией.

Второй термодинамической величиной, которой пользуются при изучении энергетических превращений в реагирующих системах является энтальпия, или общая теплота ΔH . В реакциях, протекающих при постоянном давлении (например в живом организме), калориметрическая теплота реакции складывается из двух величин: роста внутренней энергии и работы, выполненной при расширении, так как объем не является постоянной величиной:

$$(2) \quad q_p = \Delta E_p + p\Delta V = \Delta H,$$

где q означает теплоту, поглощенную в калориметре, E внутреннюю энергию реагирующей системы, а знак p указывает на то, что реакция протекает при постоянном давлении. Функция H называется энтальпией. При постоянном давлении прирост энтальпии равняется теплоте реакции.

Зная свободную энергию и теплоту реакции, можно вычислить третью основную термодинамическую величину, переменную энтропии ΔS . Она всегда больше нуля для необратимых реакций и равна нулю для обратимых реакций, при постоянной энергии E и объеме V закрытой системы

$$(3) \quad dS_{E,V} \geq 0$$

Величина перемены энтропии связана со степенью упорядочения реагирующей системы. Она растет в случаях перехода более упорядоченной системы в менее упорядоченную и становится отрицательной в противном случае.

Взаимоотношение трех упомянутых термодинамических величин, при постоянной температуре и постоянном давлении, выражено следующей формулой:

$$(4) \quad \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Полное превращение внутренней энергии при постоянной температуре и постоянном давлении:

$$(5) \quad \Delta E^0 = \Delta G^0 + T\Delta S^0 - p\Delta V^0$$

Определение вышеупомянутых термодинамических величин для отдельных этапов ферментативного катализа возможно на сегодняшний день лишь в немногих случаях. Они обладают большим значением для оценки теории ферментативного катализа, в сопоставлении с кинетикой каталитической реакции и познанием молекулярной структуры каталитического центра, так как термодинамические функции определяют только величину энергетических превращений, происходящих во время реакции. Сами по себе, они не вносят ничего нового в изучение механизма этой реакции.

Весьма выгодна термодинамика состояний ферментативного равновесия при заданных абсолютных константах скорости для отдельных этапов системы реакций, из которых состоит суммарная ферментативная реакция. При заданных величинах констант скорости ферментативной реакции можно определить константу равновесия промежуточного состояния реакции, т.е. образования активированного комплекса фермент-субстрат. Эту константу, в отличие от константы, равновесия некатализируемой химической реакции, обозначают K^* (со звездочкой).

Так же, как и при некатализируемых реакциях, имеют дело с одними и теми же термодинамическими величинами и зависимостями с той лишь разницей, что в данном случае речь идет о свободной энергии, энтальпии, энтропии и внутренней энергии активации обозначения (со звездочками):

$$(6) \quad -RT \ln K^* = \Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* = \Delta E^* - T\Delta S^* + p\Delta V^*$$

При постоянной температуре и постоянном давлении вычисляют термодинамические величины, исходя из констант скорости образования и распада активированного промежуточного комплекса ферментативной реакции. Теория абсолютных скоростей (104—105) принимает, что активированный комплекс находится в равновесии с реагентами и разлагается на производные продукты со скоростью, определяемой уравнением:

$$(7) \quad k = (kT/h)K^*$$

в котором k означает константу Больцманна, h — константу Планка, а K^* — константу равновесия перехода конечных реагентов в активированный ком-

плекс. Подставляя вместо K^* ее величину из уравнения (6) и логарифмируя, получаем:

$$(8) \quad \ln k = \ln \frac{k}{h} + \ln T - \frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R}$$

Величину ΔH^* можно определить графически, измеряя k при различных температурах и откладывая $-R \ln k$ по отношению к $1/T$. Наклон прямой равен $\Delta H^* + RT$.

Термодинамические величины активации относятся к термодинамическим величинам реакции согласно следующему уравнению:

$$(9) \quad \Delta H_1^0 = H_1^* - \Delta H_{-1}^*$$

причем 1 и -1 относятся к реакциям проходящим вправо и в обратном направлении.

Изучения влияния температуры на равновесия и скорости реакции дают величины ΔH^0 или ΔH^* , что в свою очередь позволяет определить величины ΔS^0 и ΔS^* если заданы молярные концентрации (активности). Изучение влияния давления дает величины ΔV^0 и ΔV^* , и дополнительно, при изменении температуры, ΔE^0 и ΔE^* . Логарифмическая форма уравнения производных уравнения (6) имеет следующий вид:

$$(10) \quad -\ln k = \ln \frac{kT}{h} - \frac{\Delta E^*}{RT} - \frac{p\Delta V^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{R}$$

V^* определяют при помощи графического изображения зависимости $\ln k$ от p (при постоянной температуре), причем наклон прямой равняется:

$$(11) \quad \left(\frac{d \ln k}{dp} \right)_T = - \frac{\Delta V^*}{RT}$$

Определение величин ΔV и ΔV^* имело значение при изучении денатурации белка.

На основании полученных экспериментальным путем чисел для всех упомянутых термодинамических величин составляют энергетические профили для ферментативных реакций. Примером может служить профиль свободной энергии фумаразы (рис. 24). Первый этап реакции протекает быстро и отличается относительно малой свободной энергией активации, что говорит за то, что этот этап, управляется процессом диффузии, доставляющим субстрат каталитическому центру. Дальнейшие энергетические барьеры высоки и этот этап реакции протекает медленно и характеризуется высокой энергией активации. Имеется предположение, что он связан с расслаблением электронной конфигурации на разрываемой двойной связи (106).

Профиль изменений энтальпии вдоль координаты реакции, катализируемой фумаразой, изображен на рис. 21. При его помощи можно, зная профили свободной энергии, определить превращения потенциальной энергии и энтропии во время этой реакции. В настоящее время термодинамические исследования этого рода находятся лишь в начальной фазе.

Термодинамические профили могут дать ряд указаний относительно характера сил, действующих между субстратом и ферментом в отдельных фазах ферментативного процесса. Например, наличие ионных (соляных) связей проявляет себя большими положительными энтропиями, а водородные связи — малыми отрицательными переменами энтропии.

Наличие связей типа сил ван дер Ваальса, или гидрофобных должно приводит к положительным изменениям энтропии, так как вода, вытесненная из своих положений между органическими группами, образует сеть водородных связей; следовательно степень упорядочения в растворителе повышается, а в углеводородной части субстрата и белка соответственно понижается. Можно привести много таких примеров.

Если изменять химическое строение субстрата и изучать кинетику ферментативной реакции в присутствии ингибиторов с систематически изменяемой структурой, можно на основании полученных данных (при условии, что эмпирические K_m можно считать константами равновесия исследуемой реакции)

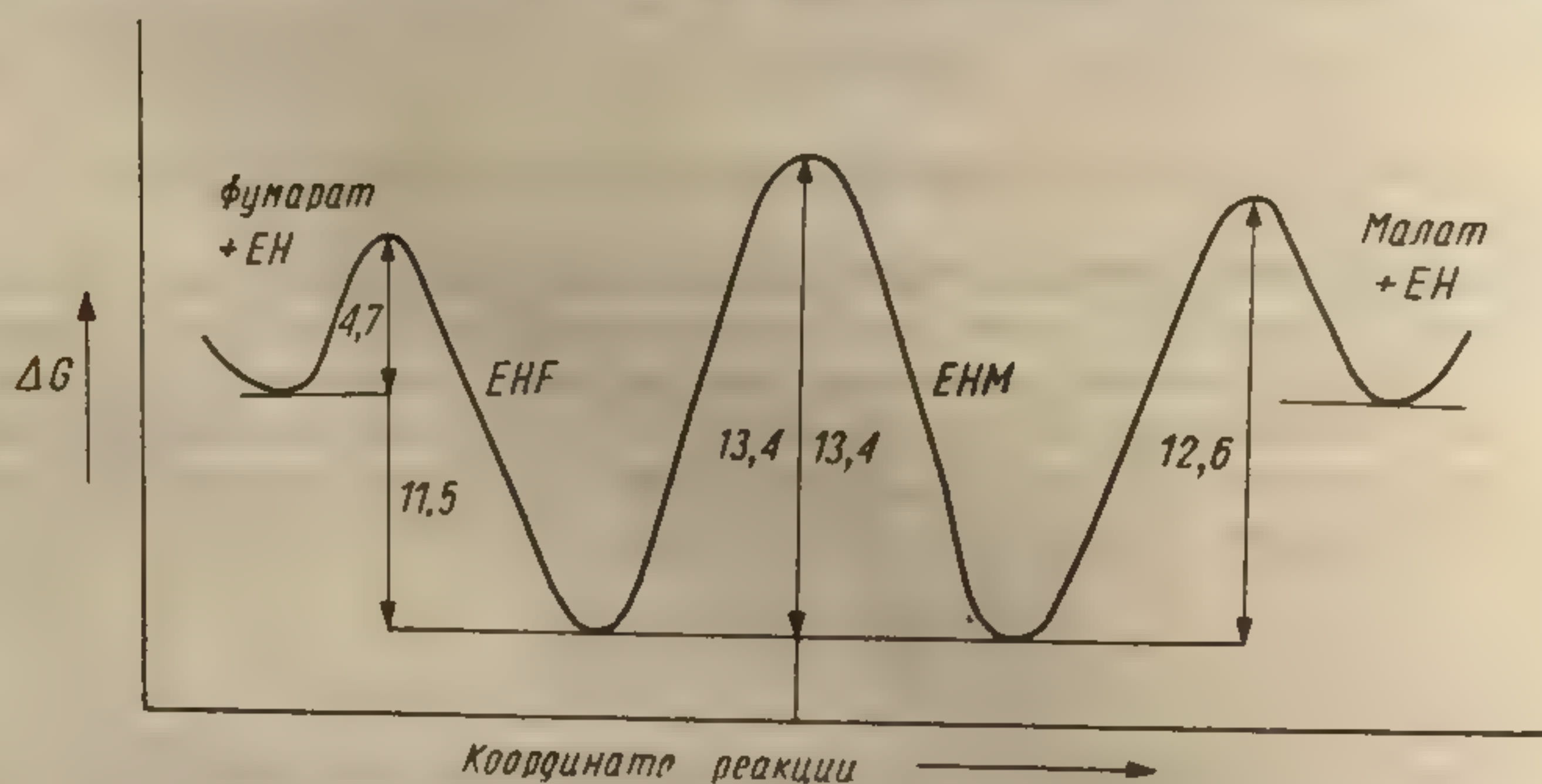


Рис. 24. Изменения свободной энергии в ходе реакции фумарат \rightleftharpoons малат, катализируемой фумаразой. ЕН означает фермент, ЕНФ комплекс фермент-фумарат, ЕНМ комплекс фермент-малат. Величины энергетических барьеров даны в ккал. (Alberty, 1957).

вычислить свободные энергии связей между определенными химическими группами субстрата и активного центра. Вычисления этого рода были произведены для ацетилхолинэстеразы (107).

Кроме того, были получены термодинамические данные ферментативных реакций, катализируемых химотрипсином, карбоксипептидазой, пепсином, уреазой и АТФ-азой. Соответствующая дискуссия была проведена Lumry ферментативного гидролиза пептидов с таковыми (гемогенных) реакций катализируемых кислотой или щелочью, или же некатализируемых (109), по помощи химотрипсина, карбоксипептидазы и пепсина. Изменения энтропии были в обоих случаях отрицательными, но их величины были ниже для пепсина и карбоксипептидазы.

На основании этих данных можно приписать ферменту свойство уменьшать энтальпию активации.

Весьма интересны изменения термодинамических величин во время термической инактивации трипсинного ингибитора (110). Если денатурация об- щий — 180 ккал/градус/моль. Сравнительно большой рост энтропии, несмотря на неизменное число молекул указывает на то, что денатурированный ингибитор образовался путем разрыва ряда связей и что отдельные химические группы обладают большей свободой (вибрационной и трансляционной), чем в нативной форме. Теплота активации в процессе денатурации составляет

55,35 ккал/моль, а для реакции в обратном направлении — 1,9 ккал/моль. Энтропия инактивации равняется 95, а в обратном направлении — 8,4 кал/градус/моль.

Реакция протекающая одновременно с большой энтальпией (теплота реакции) и большой энтропией, отличается небольшой свободной энергией, благодаря чему реакция обратима. Энтальпия активации незначительно отличается от энтальпии реакции (теплоты реакции), что указывает на то, что общая энергия активированного комплекса остается такой же, что и у денатурированной формы но значительно отличается от энергии нативной формы. Однако энтропия образования активированного комплекса составляет лишь половину общей энтропии реакции. Можно полагать, что форма комплекса находится между нативной и денатурированной формами. Активированный комплекс, переходя в неактивную форму, приобретает мало энергии, но его энтропия увеличивается за счет свободной энергии, которая превращается в кинетическую энергию трансляционных и вращательных движений химических групп.

Превращения свободной энергии в ферментативных реакциях. Теперь займемся той термодинамической величиной, которая имеет наибольшее значение при вычислении превращений энергии, сопровождающих ферментативные реакции, а именно свободной энергией. Организм не представляет собой тепловой машины и поэтому понятие теплоты реакции для биологических систем непригодно. За то ее можно охарактеризовать термодинамическим понятием свободной энергии, используемой для выполнения механической, осмотической, электрической работы, или же способной покрыть ей энергетические потребности реакций синтеза составных частей клеток.

Мы пользовались выше величиной, называемой стандартной свободной энергией. Если учесть, что химический состав биологической среды значительно отличается от стандартных условий, то становится понятной необходимость введения величины, зависящей от состава реагентов S_i , т.е. от превращений свободной энергии ΔG с которой она связана зависимостью:

$$\Delta G = -RT \ln K + RT \sum_i \ln [S_i]$$

G является аддитивной функцией и представляет собою сумму величин свободной энергии всех компонентов i реагирующей системы.

Зависимость величины ΔG от концентрации реагентов выражена уравнением

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[P_1] [P_2] \dots [P_n]}{[S_1] [S_2] \dots [S_n]}$$

где P_1 и т.д. означает продукты реакции, S_1 и т.д. субстраты реакции. В состоянии равновесия ΔG равно нулю, оно становится отрицательной величиной, если реакция спонтанно протекает вправо, и положительной, если реакция пойдет в обратном направлении. Удобнее всего выражать ΔG в калориях при температуре 25° и пользоваться логарифмами с основанием 10. Тогда

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = -1363 \log K \text{ кал.}$$

$$\Delta G = \Delta G^0 + 1363 \log \frac{[P_1] [P_2] \dots [P_n]}{[S_1] [S_2] \dots [S_n]} \text{ кал.}$$

Легко проверить, что числовая величина ΔG^0 указывает на положение равновесия. Большое отрицательное ΔG^0 означает, сдвиг равновесия вправо, большое положительное ΔG^0 означает сильный сдвиг равновесия влево. Десяти-

кратное увеличение или уменьшение концентрации одного из реактантов увеличивает или уменьшает величину ΔG на 1,363 ккал. Увеличение концентрации продукта увеличивает ΔG в положительную сторону, увеличение концентрации субстрата вызывает сдвиг в обратном направлении.

Если ΔG велико, а скорость реакции в обратном направлении мала, результирующая скорость реакции максимальна и пропорциональна концентрации фермента. По мере приближения к положению равновесия результирующая скорость убывает и становится равной нулю в положении равновесия. Тогда происходит уравнивание скоростей реакций, протекающих в противоположных направлениях.

При концентрациях реактантов, приближенных к положению равновесия, реакции идут медленно; большое количество фермента ускоряет ход реакции.

Реакции, протекающие с падением свободной энергии реакционной системы, называются экзoэргическими. Если они отличаются достаточной скоростью, то их течение может быть спонтанным. Реакции, протекающие только при условии роста свободной энергии, называются эндoэргическими. Рост энергии системы обеспечен сопряжением реакции с системой, доставляющей энергию.

В метаболических процессах происходит ряд последовательных реакций, причем продукт одной реакции становится субстратом для следующей. Для такого ряда ΔG каждой реакции должно быть отрицательным (но необязательно ΔG^0). Концентрации реагентов в стационарном состоянии должны, по крайней мере, незначительно отклоняться от концентраций, соответствующих положению равновесия для каждого звена реакционной цепи, так, чтобы ΔG было отрицательным для каждого звена. При этом условии, перенос свободной энергии становится весьма эффективным. Если реакция удалена от положения равновесия, свободная энергия рассеивается со скоростью, определяемой произведением убыли свободной энергии на моль на скорость реакции, v (т.е. число превращаемых молей в секунду)

$$-dG/dT = v\Delta G$$

Ввиду того, что биологические реакции характеризуются большим v , надлежащее использование свободной энергии для удовлетворения энергетических потребностей организма возможно только в том случае, если реакции проходят в условиях, приближенных к равновесию.

Энергетическое сопряжение в биологических реакциях. Большая часть свободной энергии биохимических реакций относится к превращению псевдосвободной энергии, ΔG^0 . Это величины, вычисляемые или измеряемые в условиях, несходных со стандартными, например при другом рН чем 0, в присутствии соли с определенной ионной силой или в присутствии ионов металлов, дающих псевдоконстанту равновесия K' . ΔG^0 можно вычислить, зная ΔG^0 и условия, при которых протекает реакция. Сводка термодинамических данных для условий, приближенных к биологическим, т.е. при рН 7,5, 0,2 атм. O_2 , 0,05 атм. CO_2 и 0,01 М концентрациях других реагентов в растворе, дается в публикациях Krebs (111), Burton и Krebs (113), Burton (112), а также Anfinsen и Kielley (114).

Johnson (115) привел величины ΔG^0 и ΔG^0 для различных рН, при молярной концентрации реагентов, давлении 1 атм. для CO_2 и для водорода, а также при концентрации воды, принятой за 1. Эти величины представлены в таблице 5. Из таблицы следует, что в биологических реакциях участвует ряд соединений, гидролиз которых сопряжен с относительно большим превращением псевдосвободной энергии ΔG^0 . К ним принадлежат нуклеотидтрифосфаты, ацилфосфаты, енолфосфаты и тиоэфирные соединения. Ферментатив-

Таблица 5

Изменения свободной энергии в биохимических реакциях (Johnson 1960)

№ реакции	Реакция	G° ккал	G°' в 0,15 М NaCl (ккал)		
			pH 6	pH 7	pH 8
1	Ацетат ⁻ + Н ⁺ + Н ₂ → ацетальдегид + Н ₂ О	-1,17	7,18	8,52	9,88
2	Ацетил-КоА + Н ₂ О → КоА + ацетат ⁻ + Н ⁺	1,06	-7,29	-8,63	-9,99
3	Ацетат ⁻ + НАД·Н ₂ + Н ⁺ → альдегид + НАД + Н ₂ О	-6,39	10,59	13,29	16,01
4	Ацетальдегид + НАД·Н ₂ → этанол + НАД	-15,14	-6,25	-5,15	-3,79
5	НАД·Н ₂ → НАД + Н ₂	-5,22	3,40	4,77	6,13
6	Ацетальдегид + КоА + НАД → ацетил-КоА + НАД·Н ₂	5,33	-3,29	-4,66	-6,02
7	Ацетил-Р ²⁻ + Н ₂ О → ацетат ⁻ + Р ²⁻ + Н ⁺	-1,36	-10,78	-11,31	-12,45
8	Ацетил-Р ²⁻ + КоА → ацетил-КоА + Р ²⁻	-2,42	-3,49	-2,67	-2,45
9	АТФ ⁴⁻ + ацетат ⁻ → АДФ ³⁻ + ацетил-Р ²⁻	2,54	3,18	3,16	3,15
10	АТФ ⁴⁻ + Н ₂ О → АДФ ³⁻ + Р ²⁻ + Н ⁺	1,18	-7,58	-8,14	-9,30
11	АТФ ⁴⁻ + глюкоза → АДФ ³⁻ + глюкозо-6-Р ²⁻ + Н ⁺	5,00	-3,05	-4,12	-5,45
12	Глюкозо-6-Р ²⁻ + Н ₂ О → глюкоза + Р ²⁻	-3,82	-4,52	-4,02	-3,85
13	Глюкозо-6-Р ²⁻ → глюкозо-1-Р ²⁻	1,75	1,70	1,74	1,75
16	Глюкозо-1-Р ²⁻ → гликоген + Р ²⁻	-0,54	-1,19	-0,73	-0,56
17	Глюкоза → гликоген + Н ₂ О	5,03	5,03	5,03	5,03
18	Глюкозо-6-Р ²⁻ → фруктозо-6-Р ²⁻	0,50	0,50	0,50	0,50
19	Глицеральдегид-3-Р ²⁻ + АДФ ³⁻ + Р ²⁻ + НАД → 3-Р-глицерат ³⁻ + НАД·Н ₂ + АТФ ⁴⁻ + Н ⁺	5,90	-2,56	-5,28	-7,00
22	Фосфопируват ³⁻ + АДФ ³⁻ + Н ⁺ → АТФ ⁴⁻ + пируват ⁻	-15,82	-6,88	-5,72	-4,37
23	Фосфопируват ³⁻ + Н ₂ О → пируват ⁻ + Р ²⁻	-14,64	-14,46	-13,86	-13,67
24	Пируват ⁻ + Н ⁺ → ацетальдегид + СО ₂	-14,41	-6,08	-4,72	-3,36
26	Пируват ⁻ + КоА + НАД → ацетил-КоА + НАД·Н ₂ + СО ₂	-9,08	-9,38	-9,38	-9,38
28	Пируват ⁻ + СО ₂ + НАДФ·Н ₂ → малат ²⁻ + НАДФ	-0,22	0,33	0,33	0,33
29	НАД + НАДФ·Н ₂ → НАД·Н ₂ + НАДФ	-0,60	-0,01	-0,01	-0,01
31	Оксалоацетат ²⁻ + ацетил-КоА + Н ₂ О → цитрат ³⁻ + КоА + Н ⁺	1,22	-7,85	-9,08	-10,43
32	Цитрат ³⁻ → изоцитрат ³⁻	1,59	1,59	1,59	1,59
33	Изоцитрат ³⁻ + НАД → α-кетоглутарат ²⁻ + НАД·Н ₂ + СО ₂	-2,01	-1,59	-1,70	-1,71
34	α-кетоглутарат ²⁻ + НАД + Р ²⁻ + АДФ ³⁻ + Н ₂ О → АТФ ⁴⁻ + сукцинат ²⁻ + НАД·Н ₂ + СО ₂	-7,76	-8,60	-9,32	-9,52
35	Глутаминат ⁻ + НАД + Н ₂ О → α-кетоглутарат ²⁻ + Н ₄ ⁺ + НАД·Н ₂ + Н ⁺	18,28	9,00	7,65	6,27
36	Малат ²⁻ + НАД → оксалоацетат ²⁻ + НАД·Н ₂ + Н ⁺	16,67	8,07	6,69	5,32
37	Оксалоацетат ²⁻ + Н ⁺ → пируват ⁻ + СО ₂	-17,05	-8,42	-7,06	-5,70

ный гидролиз последней пирофосфатной связи в АТФ сопровождается при pH 7 падением псевдосвободной энергии, равным -8,14 ккал/моль (реакция 10 в таблице 5).

Аналогичный гидролиз енолфосфопирувата дает (реакция 23) -13,86 ккал/моль. Знаменательно, что гидролиз других фосфорнокислых эфиров сочетается с гораздо меньшим падением свободной энергии, которое например для глюкозо-6-фосфата (реакция 12) равняется -4,02 ккал/моль. В отличие от них, такие соединения, как АТФ называются высокоэнергетическими.

Они имеют большое значение в биохимии, так как представляют форму накопления полезной энергии, освобождаемой в экзоэргических реакциях. Накопленная таким образом энергия может быть использована для осуществления эндоэргических реакций, если только имеется энергетическое сцепление между распадом высокоэнергетического соединения и эндоэргической реакцией.

Примером биологического энергетического сцепления является синтез гликогена из глюкозы. Прямое превращение глюкозы в гликоген невозможно, так как из величины ΔG° при pH 7 = +5030 кал. следует, что равновесие реакции полностью смещено в сторону гидролиза. Несмотря на это обстоятельство, гликоген образуется в печени и мышцах из глюкозы даже в тех случаях, если концентрация последней мала. Этот биосинтез происходит за счет свободной энергии гидролиза АТФ и АДФ, которая составляет при pH 7 —8140 кал. Необходимое для этой цели энергетическое сцепление указано в реакции 11 таблицы 5. Глюкоза реагирует с АТФ, причем образуются глюкозо-6-фосфат и АДФ. Реакция протекает спонтанно, так как ее сопровождает падение свободной энергии, равное —4120 кал., следовательно имеется значительное смещение равновесия в сторону образования глюкозо-6-фосфата. Равновесие реакции перехода глюкозо-6-фосфата в глюкозо-1-фосфат (реакция 13) несколько сдвинуто влево ($\Delta G^{\circ} = +1,740$ кал/моль при pH 7), но его достаточно для продукции необходимого количества глюкозо-1-фосфата, необходимого субстрата для синтеза гликогена. Последняя реакция (реакция 16) обладает низкой отрицательной величиной свободной энергии, что обуславливает стабилизацию равновесия в пользу образования гликогена.

Оксидоредукционные потенциалы и превращения свободной энергии. Равновесия в оксидоредукционных реакциях могут выражаться в редоксопотенциалах. При pH = 0, при котором соотношение окисленной и восстановленной форм равно 1, потенциал E_0 , сообщенный электроду из благородного металла редоксо-системой, равняется

$$E_0 = -\frac{RT}{nF} \ln K$$

где n является числом перенесенных электронов, F константой Фарадея, K константой равновесия системы, E_0 оксидоредукционным потенциалом в стандартных условиях.

Ввиду того, что

$$\Delta G^{\circ} = -RT \ln K, \text{ а } E_0 = -\frac{RT}{nF} \ln K,$$

то

$$\Delta G^{\circ} = nFE_0 \text{ выраженная в джоулях}$$

или

$$\Delta G^{\circ} (\text{в ккал.}) = n \cdot 23,05 \cdot E_0.$$

Из этой формулы следует, что электрон, проходя через перепад потенциала в 1 вольт, выполняет полезную работу в 23,05 ккал.

Оптимальные условия ΔG° для редоксо-систем были определены путем прямого измерения E_0 . Однако, почти все величины стандартной свободной энергии для реакций, в которых происходит восстановление кислорода, основаны на вычислении этих значений исходя из стандартных свободных энергий соединений, принимающих участие в реакции, или из их энтальпии и энтропии. Выбор метода обусловлен слишком медленной стабилизацией равновесия во время переноса электронов.

ИНГИБИТОРЫ И АКТИВАТОРЫ ФЕРМЕНТОВ

Ингибитор характеризуется влиянием на скорость ферментативных реакций, и тем самым на активность фермента. Его действие бывает обратимым или необратимым. Если между ингибитором и ферментом устанавливается химическое равновесие, то торможение обратимо, если же равновесия нет и ингибитор неотделим от фермента (например путем диализа), то торможение является необратимым.

Изучение влияния обратимых и необратимых ингибиторов имеет большое теоретическое и практическое значение. Например, малоновая кислота, являющаяся конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы, сыграла решающую роль в исследовании цикла дикарбоновых кислот; ядовитость африканского растения *Dichopetalum cymosum* для скота оказалась связанной с конкурентным торможением цитратдегидрогеназы в цикле трикарбоновых кислот. Целый ряд фармакологических средств и антивитаминов действует по принципу конкурентного торможения определенных ферментов.

Обратимое торможение измеримо при помощи константы равновесия между ингибитором и ферментом, K_i . Обратное число этой константы является мерой средства фермента с ингибитором. Степень торможения зависит от концентрации ингибитора и, после установления равновесия, комплекс фермент-ингибитор уже не зависит от времени.

Необратимое торможение прогрессирует с течением времени, вплоть до полного приостановления процесса. Эффективность торможения выражается константой скорости, указывающей, какая часть фермента инактивируется в данный период времени.

Типы обратимого торможения обсуждались в главе о кинетике ферментативных реакций. Ниже будет сказано о наиболее важных типах ингибиторов и о механизме торможения.

Тяжелые металлы. Соли тяжелых металлов в высоких концентрациях, как правило, необратимо инактивируют большинство ферментов и осаждают белок. Многие ферменты реагируют также на низкие концентрации солей тяжелых металлов (10^{-3} М и меньше). Необходимо также учесть промежуточный механизм торможения, при котором металл каталитически усиливает влияние атмосферного кислорода и вызывает денатурацию. Это часто обуславливает потерю активности ферментов по мере их очистки, так как следы тяжелых металлов находятся даже в химически чистых реактивах. Поэтому во время очистки ферментов и при ферментативных тестах принято пользоваться реактивами с примесью соединений, комплексующих металлы. Такими средствами предотвращающими инактивацию тяжелыми металлами являются версен (этилендиаминтетраацетат), 8-гидроксихинолин, цистеин, пирофосфатный буфер и другие. Также белок, особенно денатурированный, предохраняет ферменты от инактивации путем комплексования ионов тяжелых металлов. Комплексующие факторы позволяют отказаться от высокоочищенных реактивов и бидистиллированной воды.

Яды тяжелых металлов. Роль ингибиторов этой группы состоит в образовании постоянных комплексов с металлами, составляющими часть каталитического центра или принимающими косвенное участие в каталитическом процессе. Классическими ингибиторами этого типа являются цианиды и H_2S , тормозящие клеточное дыхание. Они тормозят большинство оксидаз, содержащих железо или медь в активной группе. Другие ингибиторы этого типа, это азид и CO , влияющие на цитохромную систему.

Цианид тормозит цитохром-оксидазу до 50 % ее активности, уже при кон-

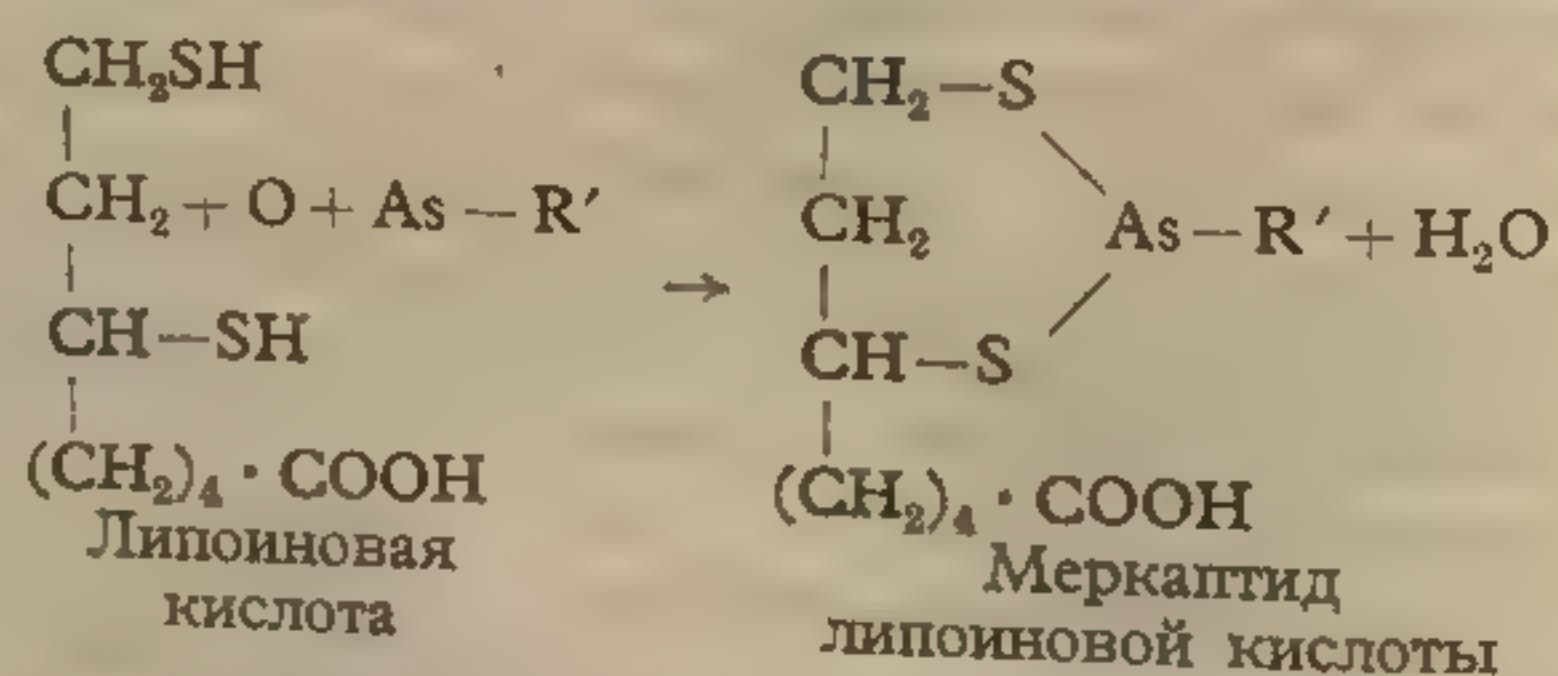
концентрации $10^{-8}M$. Ряд других металлоферментов подвергается торможению при концентрации от 10^{-2} до $10^{-6}M$, в пределах от 50 до 95%.

Цианиды ингибируют ферменты по разным причинам. Они превращают металл протетической группы, необходимый для ферментативной активности, в комплексное соединение или удаляют его в этой форме из фермента. В качестве восстановителя, цианид может разрывать дисульфидные связи или присоединяться к карбоксильным группам фермента или субстрата в стратегически важном положении.

Азид действует подобно цианиду. СО отличается более узким диапазоном действия. Она тормозит некоторые гемоферменты и купропротеиды, активные группы которых реагируют непосредственно с кислородом. СО соединяется с восстановленной формой фермента, в отличие от цианида, действующего исключительно на более окисленный металл. Торможение имеет конкурентный характер с кислородом; соединение диссоциирует под влиянием света.

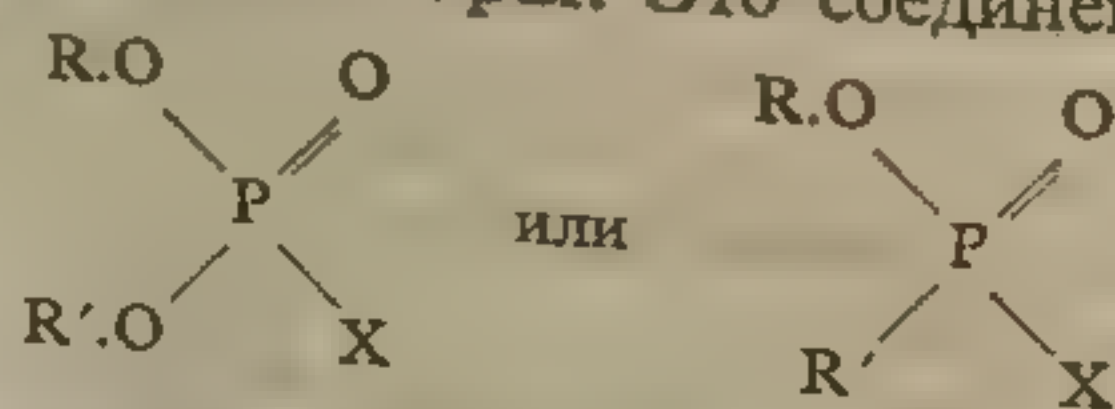
Яды тиольных групп. К ним принадлежат ингибиторы ферментов, реагирующие непосредственно с SH-группами ферментов. Их действие состоит в алкилировании, образовании меркаптидов или окислении в дисульфидные группы. К первой группе факторов принадлежит йодуксусная кислота, специфический ингибитор алкоголь-дегидрогеназы и фосфоглицеральдегид-дегидрогеназы. Они и другие галогенопроизводные (йодацетамид, хлорацетофенон) являются преимущественно необратимыми ингибиторами тех ферментов, SH-группы которых существенны для каталитической функции.

В состав второй группы ингибиторов, способствующих образованию меркаптидов, входят органические соединения ртути или мышьяка. К ним принадлежат, часто употребляемый реактив на SH-группы, п-хлормеркурибензоат и люизит. Действие этих ингибиторов обратимо. Оно нейтрализуется избытком тиольных соединений, цистеина или BAL. Торможение люизитом и родственными ему соединениями мышьяка состоит в связывании мышьяка SH-группами липоиновой кислоты, являющейся коферментом пируват-оксидазы.



Третья группа соединений, инактивирующих ферменты, действует путем окисления тиольных групп в дисульфидные. Специфическими реактивами среди них являются окисленные формы тиольных соединений, например окисленный глутатион. Общим ингибитором, действующим по тому же принципу, является йодозобензоат.

Органофосфорные ингибиторы. Это соединения общего типа:

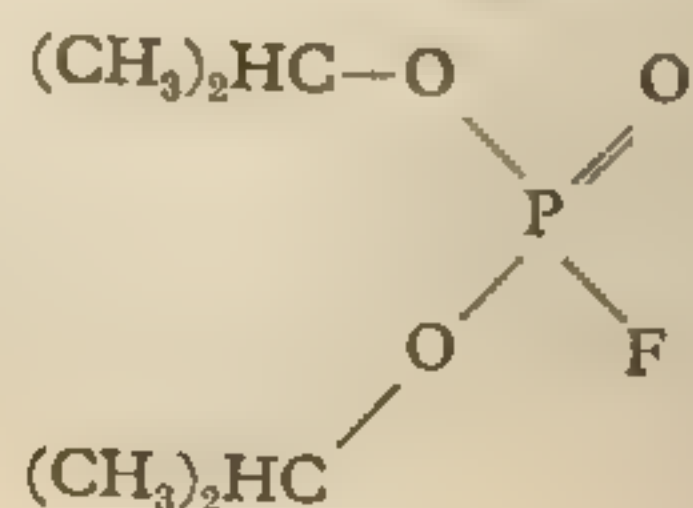


в которых R и R' представляют алкильные группы, а X представляет —F, —CN или п-нитрофенольную группу. Это специфические и мощные ингибиторы эстераз, в особенности ацетилхолинэстеразы. Они тормозят также

некоторые протеолитические ферменты (химотрипсин, трипсин, тромбин), как в отношении пептидазной, так и эстеразной активности. В этой группе ингибиторов находится ряд соединений, применяемых в качестве инсектицидов.

Ингибиторы этого типа реагируют с каталитическим центром чувствительных к ним ферментов, аналогично первому этапу ферментативной реакции с натуральным субстратом. Вместо присоединения ацильной группы субстрата к каталитическому центру происходит присоединение замещенной фосфорильной группы ингибитора и фосфорилирование фермента. Однако, фосфофермент, в отличие от ацилфермента, является стойким соединением и гидролизруется с малой скоростью.

Примером ингибитора из группы соединений органического фосфора является известный по работам над ферментами диизопропилфторфосфат (ДФФ).



Это соединение, а также подобные ему, реагирует с той же ионизирующей группой в активном центре фермента, что и естественные субстраты (116). Поэтому торможение в данном случае в значительной степени зависит от рН реакционной среды.

Антиметаболиты. Это ингибиторы, конкурирующие с субстратом в каталитическом центре фермента. По химической структуре они близки к субстрату. Они отличаются кинетикой конкурентного типа, которая вполне удовлетворительно объясняет механизм связывания субстрата ферментом. Классическим примером такого механизма является торможение сукцинат-дегидрогеназы малатом, который отличается от сукцината только отсутствием одной группы $-\text{CH}_2$. Многие замещенные диамины ингибируют диаминооксидазы. Действие многих алкалоидов сводится к конкурентному, обратимому торможению определенных ферментов. Особенно детальному анализу в этом отношении было подвергнуто влияние различных веществ на ацетилхолинэстеразу (117).

Эта тема выходит за рамки нашего учебника. Многие структурные аналоги коферментов или активных группировок в коферментах нашли разнообразное практическое применение (антивитамины, факторы, тормозящие рост новообразований и т.п.).

Антиферменты. Такие же иммунизирующие сыворотки, как для антигенных белков, получены и для многих ферментов. Их тормозящее действие заключается в реакции между ферментом и антителом (антиферментом), и в основном направлено против белка в целом, а не только против химической группировки в каталитическом центре. Примером может служить о-дифенол-оксидаза, сохраняющая полную активность после осаждения иммунотерапевтической сывороткой. Однако, если группировка каталитического центра обладает антигенными свойствами, образуются специфические и сильные антитела, конкурирующие с субстратом за активный центр. Например у фосфолипаз антитела полностью инактивируют фермент. Доказано, что у щелочной фосфатазы каталитический центр и антигенные группы локализованы в разных местах молекулы фермента.

Антиферменты сыграли важную роль в деле выяснения механизма ферментной адаптации и индукции.

Антиферменты широко обсуждаются Marrack (118).

Активаторы ферментов. Естественными активаторами ферментов являются коферменты, которые принимают прямое участие в каталитической активности, выполняя роль переносчиков определенных атомов или химических групп. Их роль и структура обсуждались отдельно (стр. 16). Здесь будет речь о таких активаторах, которые, сами не принимая участия в каталитической реакции, переводят неактивный фермент в каталитически активную форму или увеличивают его активность.

Из ионов металлов, на активность многих ферментов влияют: NH_4^+ , Na^+ , Mg^{++} , Al^{+++} , K^+ , Ca^{++} , Mn^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Fe^{+++} , Ni^{++} , Cr^{+++} , Co^{++} , Rb^+ , Cs^+ . Ионы тяжелых металлов оказывают тормозящее влияние. Действие катионов в основном довольно специфично, но в большинстве случаев фермент активируется более, чем одним катионом. Наблюдается также явление антагонизма между ионами. Наиболее известен антагонизм между Na^+ и K^+ и между Mg^{++} и Ca^{++} . Этот антагонизм обычно состоит в конкурентном торможении (например Mn^{++} и Zn^{++} по отношению к имидопептидазе, 119).

Магний является природным активатором ферментов, действующих на фосфорилированные субстраты (фосфогидролазы, фосфокиназы, синтетазы), но его можно заменить марганцем.

Подробный обзор активирования катионами дан в публикации Lehninger (120).

Анионы в общем мало влияют на активность ферментов, и их воздействие лишено специфичности. Исключением является амилаза, активируемая хлоридом, а также, в меньшей степени, другими галогенами. Анализ действия солей значительно затрудняется из-за их физического воздействия на коллоиды и связывания белками, поэтому взгляды на их роль в качестве активаторов лишены убедительных экспериментальных обоснований.

При исследовании влияния активирующей концентрации иона на скорость ферментативной реакции, при низких концентрациях иона обычно получается кривая типа Michaelis-Menten. Влияние активирующего иона изменяется также в зависимости от pH. Степень очистки фермента также влияет на диапазон активирующих концентраций и на специфичность активации. Фермент высокой чистоты неоднократно проявляет большую избирательность по отношению к активирующим ионам. Например, неочищенная аргиназа сильнее всего активируется Co^{++} , в меньшей степени Mn^{++} и слабо Ni^{++} . Для очищенной аргиназы активатором является исключительно Mn^{++} (121).

Активирующее действие ионов металлов идет по разным путям. Наиболее ясным и типичным механизмом является введение иона в структуру каталитического центра фермента, который без него не проявляет активности. Это типичная функция металла в роли кофермента. Другой, довольно частой функцией активирующего металла является образование связи между ферментом и субстратом, или между ферментом, коферментом и субстратом. Пример такого механизма приведен выше (стр. 14). Ионы металлов могут смещать положение равновесия ферментативной реакции. Это бывает, например, последствием образования комплекса субстрата с металлом. Может также произойти комплексообразование металла с продуктом реакции и соответствующий сдвиг положения равновесия. В данном случае происходит кажущаяся активация. Бывает также комплексообразование ингибитора или вытеснение собственно активирующего иона из каталитического центра.

Анализ механизмов активации ионами, вследствие методических трудностей, находится еще в начальной стадии. Все более, однако, распространяется

мнение о необходимости металла для каждой ферментативной реакции и в структуре молекулы нативных ферментов.

Активация путем устранения ингибитора. Активаторами некоторых ферментов являются протеолитические ферменты, отторгающие от фермента пептидный активатор путем гидролитического разрыва одной или многих пептидных связей. Неактивные формы пепсина, трипсина, химотрипсина, карбоксипептидазы выделяются многими железами в форме зимогенов. Примером механизма такой активации может служить превращение трипсиногена в трипсин (122). Под влиянием соответствующего специфического фермента (им может быть сам фермент — тогда процесс активации протекает аутокаталитически), от конца пептидной цепи гексапептид отторгается следующего состава:

вал-асп-асп-асп-асп-лиз.

Отрыв пептида является последствием гидролиза одной только связи между лизином и изолейцином (рис. 25). Появление ферментативной активности происходит после приближения освобожденного конца пептидной цепи к каталитическому центру, который раньше был закрыт. Контактной аминокисло-

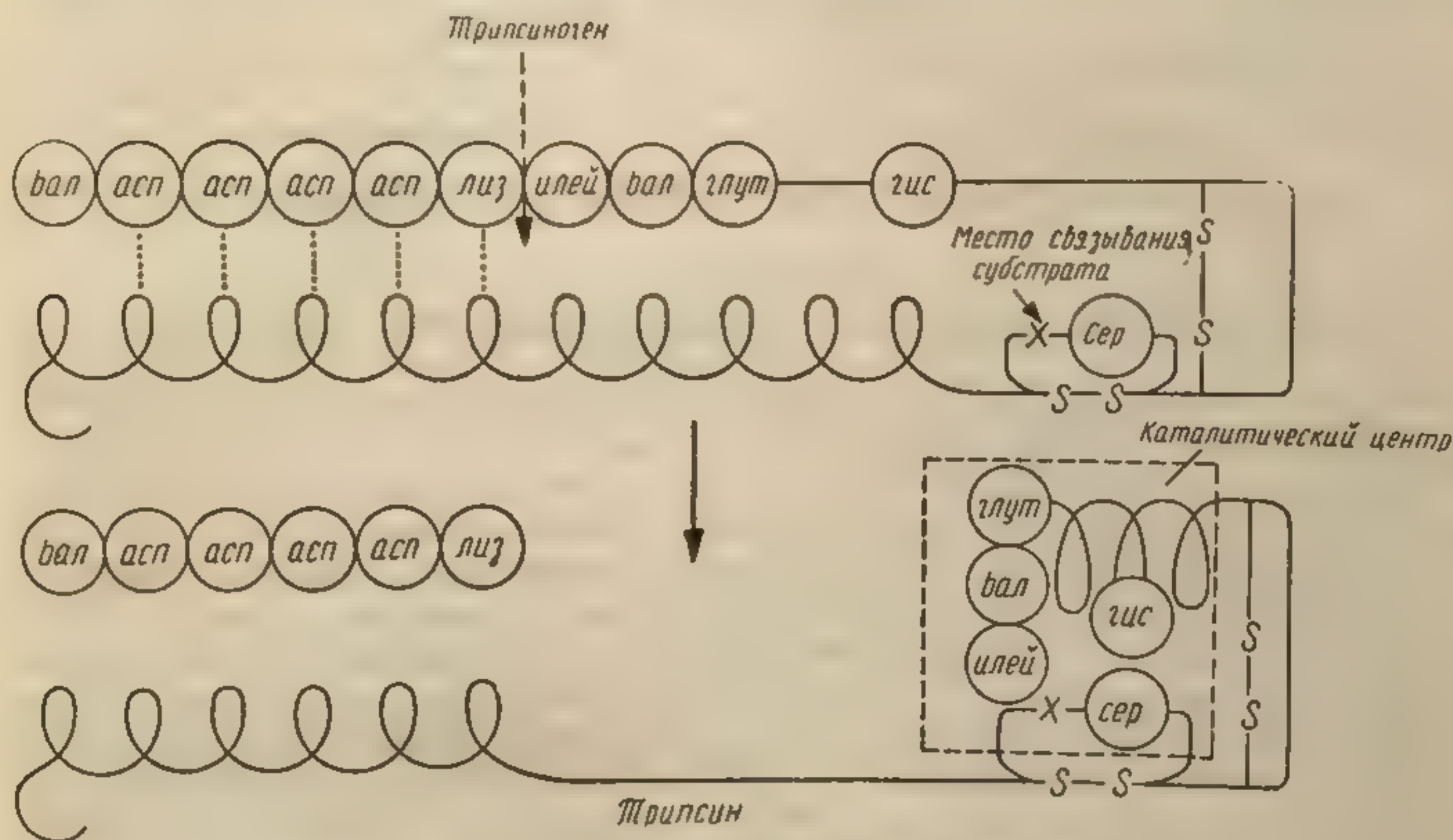
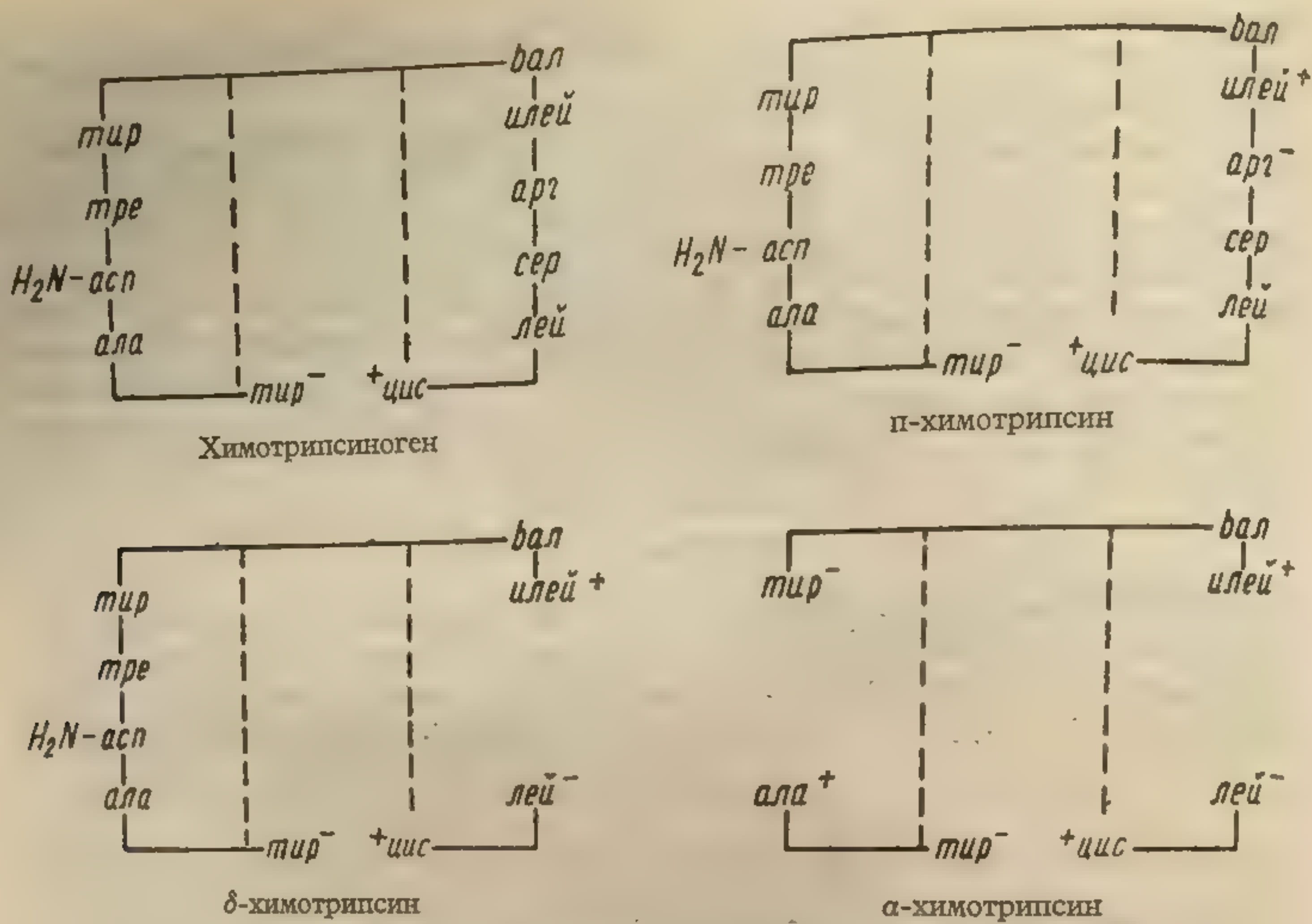


Рис. 25. Активация трипсиногена в трипсин.

той, необходимой для катализа, является серин, но необходима также и близость гистидиновой группы, которая после освобождения конца пептидной цепи от ингибитора приближается к сериновой группе. Таким образом формируется активный каталитический центр, бывший до этого „замаскированным“ присутствием ингибитора.

Активация химотрипсиногена представляет более сложный процесс, в ходе которого по очереди разрушаются определенные пептидные связи. При этом образуются разные формы химотрипсина, обозначаемые при активации α -химотрипсиногена символами α -, δ -, π -химотрипсинов. Они отличаются разной активностью. Приводимая ниже схема активации химотрипсиногена основана на сообщениях Jacobsen, Neurath и Desnuelle (123—126).



Активация химотрипсиногена (пунктир обозначает дисульфидные мостики)

ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ ТОПОГРАФИЯ ФЕРМЕНТОВ

Живая клетка представляет собой высокоорганизованную систему, в которой ферменты имеют определенную локализацию. Топография ферментов исследуется гистохимическими методами, а также фракционированием в центрифугах с применением градиента концентрации. Первый из этих методов дополняется обработкой специфическими ферментами (например рибонуклеазой) тканевых и клеточных срезов и техникой промывки срезов.

Фракционирование в гипертонических растворах сахарозы, при воздействии поля центробежной силы, позволило разделить гомогенизированные клетки на ядра, митохондрии, микросомы и мелкие зернистости. Исследуют также жидкость, отделяющуюся от центрифугата. Специфические ферментативные тесты позволяют определять концентрацию метаболитов, коферментов и ферментов в отдельных фракциях.

Наука располагает большим количеством наблюдений в области внутриклеточной локализации ферментов (127, 128, 129). К сожалению, большинство результатов технически несовершенно; поэтому не все выводы можно считать обоснованными. Это в особенности касается ошибок, обусловленных явлением абсорбции ферментов клеточными структурами; поэтому интерпретация результатов требует исключительной осторожности.

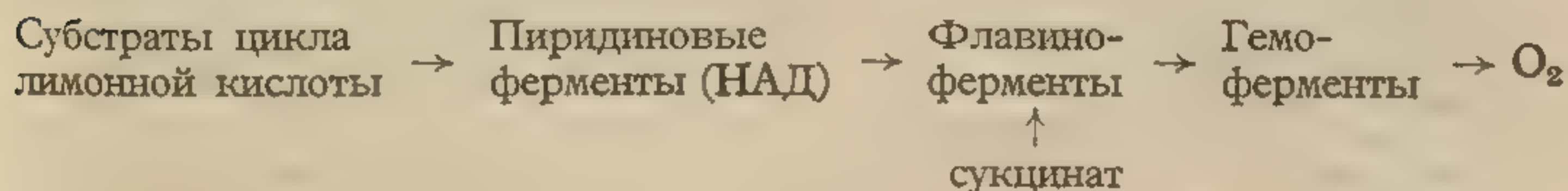
Тем не менее, целый ряд важных наблюдений подвел основу под современные представления о внутриклеточной локализации, не только индивидуальных ферментов, но и многоферментных систем, выполняющих сложные метаболические функции. Например, стало известным, что все ферменты, принимающие участие в переносе электронов цитохромной системой, находятся исключительно в митохондриях, а ферменты гликолитического ряда встречаются почти исключительно в цитоплазме.

Главным образом в митохондриях находятся ферменты, катализирующие окисление и синтез жирных кислот. Окисление сукцината и кислородное фосфорилирование также происходят в митохондриях. О специализированной функции митохондрий свидетельствует относительно большое накопление в них коферментов и активаторов. Например, ион калия отличается особенно высокой концентрацией в митохондриях. Это относится и к АТФ, который составляет до 10% сухого веса митохондрий. Наличие столь высокой концентрации соединения, служащего источником химической энергии, указывает на главную, если не исключительную роль митохондрий в производстве, накоплении и использовании энергии для нужд биологического синтеза.

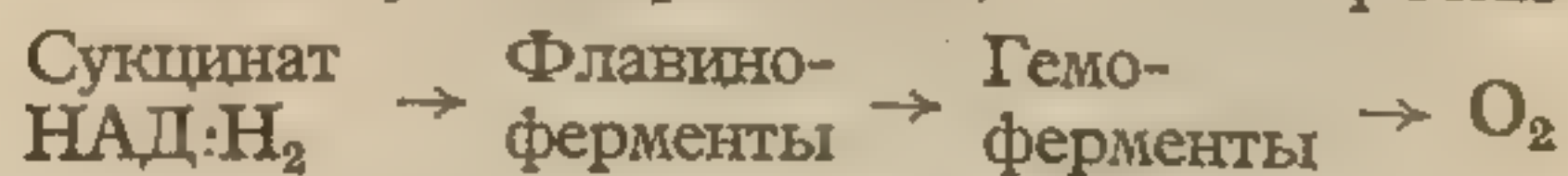
В микросомах встречаются преимущественно гидролизующие ферменты, особенно эстеразы. Ферменты, принимающие участие в синтезе белка по-видимому, также локализируются в микросомах. Об этом свидетельствуют в первую очередь результаты опытов с включением радиоактивных аминокислот в синтезируемый белок.

За последние годы удалось выявить дальнейшую морфологическую и ферментную дифференциацию клеточных зернистостей. Особенно интересны опыты Green с т.н. молекулами, переносящими электроны (129). Если на т.н. тяжелые митохондрии из мышцы сердца действовать ультразвуками, то они подвергаются фрагментации. Некоторые фрагменты сохраняют полную способность переносить электроны, окислять сукцинат, но теряют почти все ферменты, катализирующие окисление в цикле цитратов. Компоненты митохондрий и такой молекулы представлены на следующей схеме:

Митохондрия



Молекула переносящая электроны



Молекула, переносящая электроны, окисляет сукцинат и НАД·H₂. При этом сохраняется способность кислородного фосфорилирования АДФ из неорганического фосфата.

Фрагментирование митохондрий ультразвуками в присутствии ионов магния приводит к появлению молекул, переносящих электроны, но лишенных способности кислородного фосфорилирования.

Молекула, переносящая электроны и не фосфорилирующая, содержит 4 рода цитохромов, 2 рода флавиноферментов, кроме того многочисленные липопротеиды, негемовое железо, медь и магний. Из коферментов, в довольно больших концентрациях встречаются НАД и АТФ. Железо распределяется вдоль цепи транспорта электронов, медь скапливается вблизи цитохром-оксидазы, а магний главным образом связан с АТФ.

Для молекул, способных к кислородному фосфорилированию, характерно присутствие кофермента Q в восстановленной форме. Это хинон, связанный с одним из липопротеидов.

Мало известно о локализации ферментов в клеточном ядре, так как большинство обнаруживаемых в нем ферментов встречается в весьма малых

Таблица 6

Локализация ферментов в интрацеллюлярных структурах печени грызунов
(Dixon и Webb, 1958)

	Ядро	Митохон- дрии	Микросомы	Жидкость над центри- фугатом
А. Ферменты, находящиеся главным образом в ядре				
НАД-пирофосфорилаза	+	—	+	
Б. Ферменты, находящиеся главным образом в митохондриях				
Кислая фосфатаза	—	+	+	±
Арилсульфатаза (действует на сер- ноислый нитрокатехол)	±	+	+	+
Глутаминат-дегидрогеназа	—	+	—	
Изоцитрат-дегидрогеназа (НАД)	—	+	—	—
Сукцинат-дегидрогеназа	—	+	—	—
Цитохромоксидаза	—	+	—	—
Уратоксидаза	±	+	±	—
Аденилаткиназа	±	+	—	—
Рибонуклеаза	—	+	+	+
Ацетил-КоА-трансфераза		+		
В. Ферменты, находящиеся главным образом в микросомах				
Карбоксилэстераза	—	+	+	+
Ацетилхолинэстераза	—	±	+	—
Холинэстераза	±	±	+	—
Эстераза витамина А	—	—	+	—
Холестеролэстераза	+	—	+	—
Щелочная фосфатаза	±	—	+	—
Глюкозо-6-фосфатаза	—	±	+	±
Арилсульфатаза (действующая на ацетилфенилсульфат)	±	+	+	—
Холил-КоА-синтетаза		±	+	±
Г. Растворимые ферменты, находящиеся преимущественно в жидкости над центрифугатом				
Лейцинаминопептидаза	—	±	±	+
Аденозин-дезаминаза	—	—	—	+
Гексозодифосфатаза	—	—	—	+
Лактатдегидрогеназа	—	—	—	+
Изоцитратдегидрогеназа (НАДФ)	—	±	—	+
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	—	—	—	+
Глутатион-редуктаза	—	—	—	+
Аспартат-аминотрансфераза	—	—	+	+
Глюкокиназа	—	±	+	+
Кетогексокиназа	—	—	—	+
Фосфоглюкомутаза	—	—	—	+
ФАД-пирофосфорилаза	—	—	—	+
Глюкозан-фосфорилаза	±	—	—	+
Нуклеозид-рибозил-трансфераза	±	—	—	+
Аконитатгидратаза	±	—	—	+
Альдолаза	+	+	—	+
Д. Ферменты, находящиеся во многих фракциях				
Аргиназа	+	±	+	—
β-глюкуронидаза	+	+	+	±
Каталаза	—	+	+	+
Фумараза	—	+	+	+
АТФ-аза (активируемая Са)	+	+	+	—

количествах. Только НАД-пирофосфорилаза находится исключительно в ядре. Изолированные хромосомы в ядре изобилуют щелочной фосфатазой.

Детальная локализация ферментов в печеночных клетках крысы составлена Dixon и Webb (130), у которых заимствована таблица 6.

РЕГУЛЯЦИЯ И КОНТРОЛЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

До сих пор рассматривались свойства ферментов, изолированных из клеток и по возможности тщательно очищенных, *in vitro*. В клетках, как правило, встречаются многоферментные системы; помимо того, в них имеется пространственная локализация ферментов или т.н. ферментная топография, о которой была речь в предыдущей главе. Для клеточного метаболизма характерно наличие многочисленных метаболических направлений, требующих координации активности многоферментных систем, в которых каждый фермент катализирует только одну определенную реакцию. В ферментных системах отдельные звенья функционально сопряжены друг с другом общими метаболитами. Продукт определенной ферментативной реакции является субстратом для следующей. Реакции, как правило, обратимы, поэтому метаболиты должны быть одновременно субстратами для двух ферментов, катализирующих реакцию в противоположных направлениях.

Помимо пространственной организации многоферментных систем связанной с внутриклеточными структурами, существует координация посредством субстратной специфичности. Она относится к тем ферментам, которые по своей растворимости находятся в цитоплазме без определенной локализации. В данном случае направление превращений зависит от специфичности фермента, выбирающего подходящий субстрат и передающего продукт среде. В этом случае также действуют многоферментные системы, координированная работа которых является результатом их химической специфичности.

Примером системы, в которой представлены оба рода организации, может служить 3-фосфоглицериновый цикл Buecher (131). В цитоплазме находится

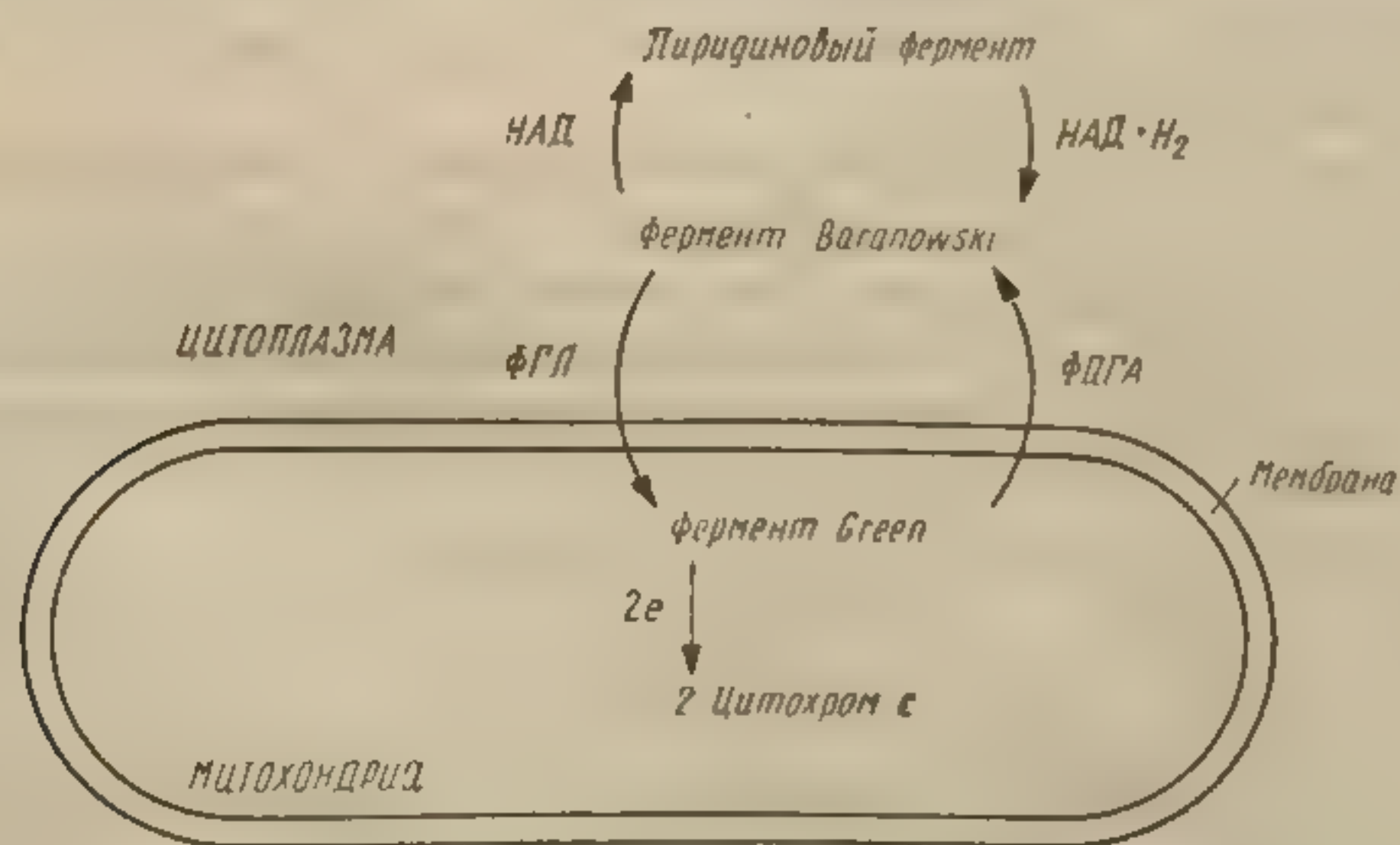


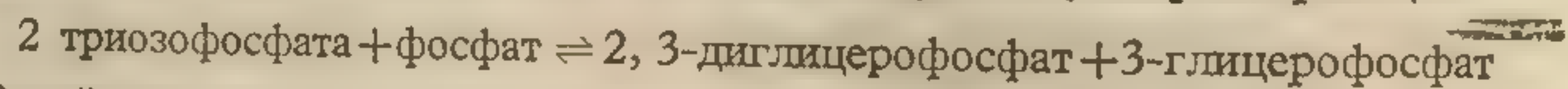
Рис. 26. 3-глицерофосфатный цикл (Bücher).

растворимая 3-фосфоглицерин-дегидрогеназа (фермент Baranowski), а в митохондриях — нерастворимая и связанная с мембраной и перегородками дегидрогеназа того же субстрата (фермент Green). Растворимый фермент отнимает посредством НАД 2 атома водорода у цитоплазматических доноров и восстанавливает фосфодигидроацетон (ФДГА) в 3-фосфоглицерин. Продукт этой

реакции проникает через митохондриальную мембрану и становится субстратом нерастворимой, структурно локализованной дегидрогеназы, функционально и топографически связанной с цитохромной системой (через цитохром с). Цитохромы отнимают посредством нерастворимой дегидрогеназы электроны (а тем самым и протоны) у 3-фосфоглицерина, который окисляется в ФДГА. Этот продукт переходит в цитоплазму и становится снова субстратом для растворимой дегидрогеназы. Таким образом цикл замыкается; одновременно образуется метаболический путь для атомов водорода, которому они продвигаются от доноров водорода в цитоплазме к кислороду, используемому в митохондриях.

В реакциях переноса химических групп часто встречаются многоферментные системы, функционально сопряженные, если эти ферменты располагают одним и тем же коферментом. Типичным примером являются дегидрогеназы, простетическую группу которых составляют неустойчиво присоединенные НАД или НАД·Н₂. Тогда диссоциирующий кофермент передает или отнимает атомы водорода у нескольких ферментов.

Такое положение создается во время т.н. дизмутации триозофосфатов при гликолизе. Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа катализирует перенос 2 атомов водорода с глицеральдегид-3-фосфата на НАД. Восстановленный НАД, т.е. НАД·Н₂, передает, при каталитическим влиянии 3-глицерофосфатдегидрогеназы, эти 2 атома водорода на ФДГА, который превращается в 3-глицерофосфат. Третий фермент, триозофосфатизомераза катализирует взаимное превращение этих двух сложных эфиров. Суммарная реакция:



В ней принимают участие 3 фермента, функционально сопряженные.

Есть много примеров функциональных или структурных сопряжений. Об этом писал Dixon (140).

Функциональное или структурное сопряжение выражается наличием определенных многоферментных систем в составе структурных единиц клеточной организации. Такова система, переносящая электроны в митохондриях, выделенная Gheen в виде покрытых мембраной зернистостей, т.н. молекулы, переносящие электроны. О них говорилось более подробно в главе о локализации ферментов в клетке (стр. 98).

Обобщая, можно сказать, что основой метаболизма является сеть ферментных систем, координируемая деятельностью которых обеспечивает производственную деятельность, которую можно назвать метаболическим контролем, требующим адаптации каждого этапа реакции, катализируемой ферментом, к потребностям организма, как целого.

Координация хода многочисленных реакций требует гармонизации скорости индивидуальных реакций. Скорость каждой индивидуальной реакции зависит от количества активных молекул фермента, а также от скорости, с какой изменяются молекулы метаболитов. На эту скорость влияют такие факторы, как концентрация метаболита, локальное рН и оксидоредукционный потенциал, торможение реакции образующимся продуктом, или влияние ингибиторов и т.п. Некоторые метаболиты могут действовать как активаторы или депрессоры синтеза ферментов, и возбуждать или подавлять их активность. Об этом будет сказано в следующей главе.

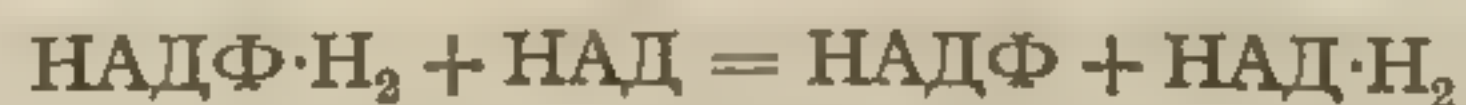
Помимо этого типа метаболической регуляции существует также и гормональная, не говоря уже о нейрорегуляции, которая также представляет собой определенную форму биохимического управления посредством ферментов.

Метаболическая регуляция ферментативной активности представляет весьма сложные проблемы и, несмотря на применение современной исследовательской техники, еще далеко не расшифрована. Поэтому здесь будут упомянуты только те механизмы регуляции, которые подтвердились опытами *in vivo*. Экстраполяция результатов исследования изолированных ферментов на организованные ферментные системы *in vivo* довольно рискованна.

На активность фермента, кроме индукции или репрессии, обнаруженных на сегодняшний день только у бактерий, могут влиять такие факторы, как обратимая диссоциация простетической группы или обратимое присоединение специфического ингибитора. Известно также, что ряд ферментов является SH-ферментами и их активность зависит от наличия свободных SH-групп. В главе об активаторах ферментов обсуждались некоторые механизмы активации. Особенно важна роль ионов металлов. Их подвижностью по отношению к ферментам, локализованным в определенных отделах клеток, можно объяснить быстрое течение ряда физиологических реакций. Так по крайней мере пытались подойти к вопросу о роли магния и кальция в процессе сокращения мышцы, вызванном поляризацией окончания двигательного нерва.

Большую роль в регуляции метаболических процессов играют гормоны. Они могут ускорять или замедлять жизненные процессы. Биохимический механизм их активности представляет весьма любопытную проблему. На сегодняшний день еще невозможно сделать общие выводы и создать теорию гормональной активности, но уже имеются доказательства влияния известных гормонов на известные ферменты. Обзор материалов по этому вопросу находится в ряде статей (133—135).

Лучше других исследованы ферментативные аспекты действия эстрогенных гормонов, вероятно потому, что они вызывают быстрый рост эндометрия, плаценты, молочной железы, а также резкие изменения метаболизма. Под влиянием эстрогенов, только в упомянутых органах, было обнаружено резкое повышение потребления кислорода, главным образом за счет усиленного сгорания лимонной кислоты. Интенсификация этих превращений столь низкими концентрациями эстрогенов, как $4 \cdot 10^{-9}$ эстрадиола, была доказана на срезах плаценты. Исследования, проводимые при помощи метаболитов и ингибиторов, доказали, что в данном случае происходит активация изоцитратдегидрогеназы. Оказалось, что это был косвенный эффект, и что по существу дело заключается в снабжении фермента коферментом, в данном случае НАДФ. Этот кофермент образуется путем трансгидрогенации $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ в НАД, катализируемой трансгидрогеназой. Именно этот фермент оказывается чувствительным к эстрогенам, что подтвердилось на очищенном препарате. Все органы, реагирующие на эстрогены, содержат эстрогеночувствительную $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ -трансгидрогеназу, катализирующую реакцию

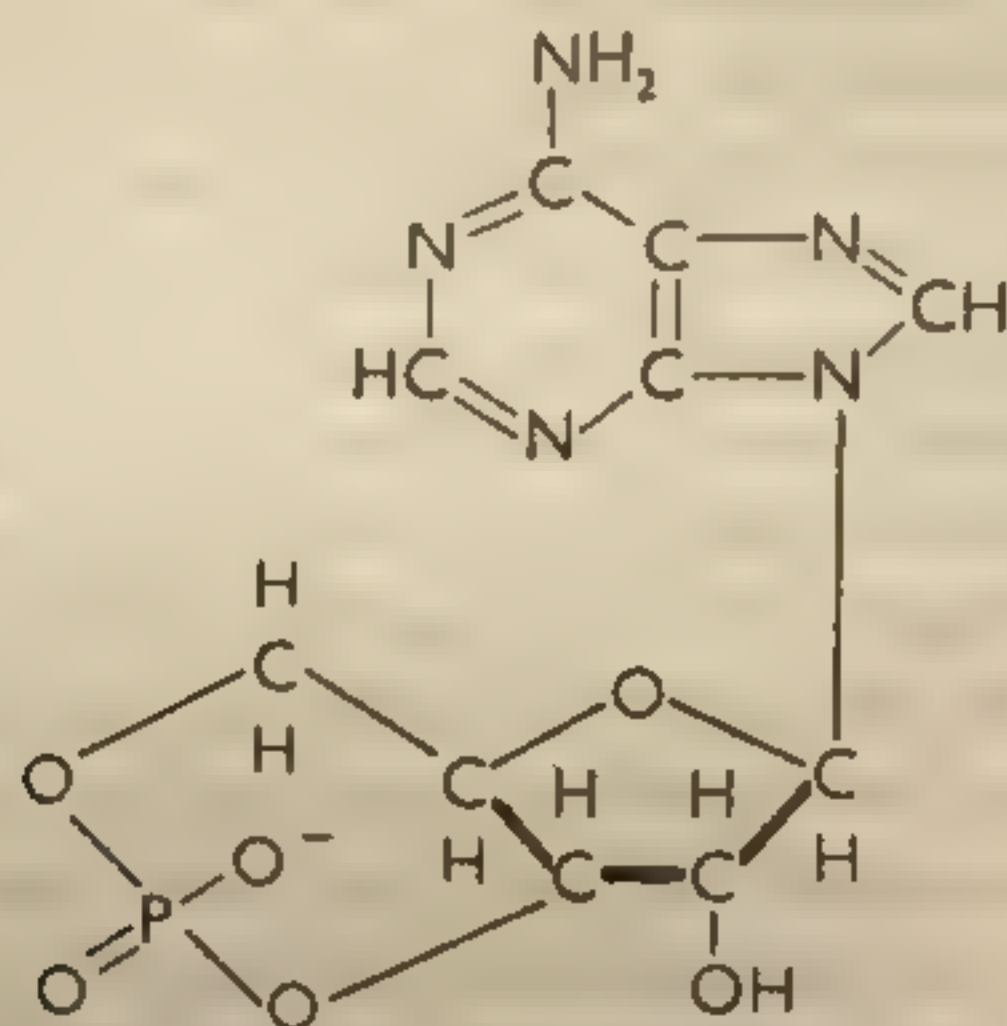


Та же трансгидрогеназа в других органах не реагирует на гормоны.

Кинетические исследования показали, что механизм действия эстрогенов на этот фермент состоит в их соединении с неактивной формой фермента и превращении ее в активную форму (136). Усиленное производство НАДФ стимулирует синтетические процессы, а появление $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ усиливает окисление посредством цитохромной системы, и тем самым способствует накоплению энергии в процессе кислородного фосфорилирования. Последствием эстрогенной стимуляции является накопление высокоэнергетических фосфатов, что в свою очередь увеличивает синтез белков, липоидов и нуклеиновых кислот. Результатом этого процесса является знакомый эффект гиперплазии матки или плаценты.

Другим примером влияния гормонов на фермент является образование активной фосфорилазы в печени под влиянием адреналина или глюкагона (137). На срезах и гомогенатах из печени этот эффект наблюдался при концентрации адреналина $10^{-7}M$, а глюкагона $10^{-8}M$. В результате действия этих гормонов происходил гликогенолиз и увеличивалось производство глюкозы с одновременным повышением активности глюканфосфорилазы.

Стимулирующий гормональный эффект на фосфорилазу не является однако прямым процессом. Sutherland и сотр. (137) доказали, что под влиянием гормонов образуется неизвестным образом аденилнуклеотид:



Аденозин-3'-5'-фосфат (циклический аденилнуклеотид)

дающий в больших разведениях ($10^{-7}M$ в гомогенатах, $10^{-5}M$ в срезах) те же метаболические эффекты, что и гормоны. Аналогичным механизмом гормонального действия отличается кортикотрофин. Последний также служит промежуточным активатором глюканфосфорилазы в корке надпочечников. В этой реакции также образуется аденилнуклеотид в качестве промежуточного продукта.

Многие гормоны влияют определенным образом на метаболизм. Знакомо стимулирующее действие инсулина на липогенез, дискоординация фосфорилирования и окисления, вызываемая тироксином, стимулирование синтеза белка соматотропином и много других метаболических эффектов действия гормонов. Эти эффекты не будут предметом обсуждения в этом учебнике, так как до сих пор неизвестно, на какие ферменты и каким образом действуют упомянутые гормоны.

Среди рекомендуемых механизмов регуляции ферментативной активности заслуживает внимания открытое в последнее время торможение ферментов продуктами реакции, весьма отдаленной в цепи превращений от превращения катализируемого тормозимым ферментом. Торможение некоторых ферментов продуктом реакции издавна известно. В данном случае имеет место механизм отрицательной обратной связи (138) между отдаленными звеньями этой цепи.

Ингибиторы ферментов могут возникать как продукты реакции отдельных, но сопряженных реакционных цепей. Примером служит 6-фосфоглюконовая кислота, сильный ингибитор глюкозо-6-фосфат-изомеразы (139), превращающей этот сложный эфир в фруктозо-6-фосфат. Следовательно, фермент находится на пути гликолитического превращения сахара, а не кислородного процесса, ведущего к образованию 6-фосфоглюконовой кислоты.

Другим примером является известный эффект Пастёра, состоящий в торможении гликолиза дыханием. Механизм этой реакции до сих пор не выяснен; предполагается торможение чувствительных к кислороду ферментов или торможение фосфогексокиназы некоторыми метаболитами дыхания (141).

Наконец, к упомянутым вскользь вопросам метаболической регуляции (143), следует прибавить влияние проницаемости клеточных и митохондриальных мембран, во многих случаях избирательное для определенных метаболитов. Этот важный фактор определяет направление метаболических процессов и точку ферментативного равновесия. Активный транспорт ионов и метаболитов обеспечивается ферментными системами с общим названием пермеаз, проявляющими (у бактерий) свойства индуцированных ферментов (142).

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Согласно современным взглядам, первичная структура молекулы белка, т.е. длина пептидной цепи и последовательность аминокислот генетически детерминирована. Веществом, с которым связан перенос наследственных признаков на клетки потомства, является дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК). Это нуклеотидный полимер, в котором встречаются четыре рода нуклеотидов, различных по роду пуринового или пиримидинового основания. По Crick (144) первичное строение молекулы ДНК, т.е. последовательность нуклеотидов, определяет последовательность аминокислот в полипептидной цепи белка. Последовательность нуклеотидов является формой записи генетической информации, находящей отражение в строении молекулы белка, а следовательно, и в строении ферментов.

Мутация в области генетического локуса в хромосоме обычно состоит в замещении нуклеотидной пары в двойной спирали ДНК другой парой. Это означает ошибочную запись в данном месте, результатом чего является изменение в структуре молекулы белка.

Оно состоит в замене одной аминокислоты другой или в лишении пептидной цепи некоторых аминокислот.

Весьма вероятно, что положение каждой аминокислоты в пептидной цепи определено триплетом пар нуклеотидов, а тем самым триплетом пар оснований, спаренных между собой соответствующим образом (по образцу аденин-цитозин и гуанин-тимин) в соседних отрезках двойной спирали. Из 64 возможных триплетов в молекуле ДНК 44 ничего не определяют, а только разделяют те, которые в числе 20 определяют положение каждой аминокислоты в пептидной цепи.

Замена одной пары нуклеотидов другой парой, в процессе мутации, образует новую триплетную группировку, что влечет за собой замену одной аминокислоты другой, свойственной этому триплету, или же формирует новую группировку, лишенную значения с точки зрения генетической информации; в том случае пептидная цепь будет неполной, или вообще не образуется. Примеры первого механизма встречаются у многочисленных разновидностей гемоглобина (145). Garen и Levinthal (146) дали доказательство полного прекращения синтеза белка в результате мутации.

Мутации могут тройным образом влиять на ферментативную активность: 1) вызывают качественное изменение в структуре фермента; 2) вызывают количественное изменение в синтезе ферментов; 3) косвенно влияют на активность фермента, не вызывая ни качественного, ни количественного изменения.

Среди последствий мутации у *neurospora* чаще всего встречается появление у определенного фермента увеличенной чувствительности к повышенной температуре или к денатурирующим факторам. Так, для локуса, определяющего стойкость тирозиназы по отношению к повышенной температуре был найден аллель, обуславливающий ее неустойчивость (147—149). Следовательно, существует пара аллелей T^s и T^l для стойкой и лабильной форм тиро-

зиказы. Была выявлена также пара аллелей (150), генетически детерминированных двумя дальнейшими типами тирозиназы, отличающихся от предыдущих термостабильностью и электрофоретической подвижностью. На свойства тирозиназы влияют также мутации в других локусах, которые, например, не оказывая влияния на род производимой тирозиназы, имеют решающее значение для производства этого фермента.

Имеется ряд примеров такой генетической детерминации свойств ферментов. Мутанты микроорганизмов содержат ферменты, различные по термостабильности, электрофоретической подвижности, величине кажущейся энергии активации, величине константы Михаэлиса для отдельных субстратов, а также по удельной активности фермента после насыщения последним субстратом.

Образование неактивной формы фермента было выявлено у мутантов *neurospora*, у которых мутации происходили в сопряженной группе генов, ответственных за синтез триптофана (151, 152). Мутант производил белок, который реагировал с антителом для триптофансинтетазы, но обладал (153) остаточной ферментативной активностью. Детальный анализ локуса дт в сопряженной группе 2 мутантов *neurospora* показал, что в нормальном (диком) типе триптофансинтетаза является белком, состоящим из двух компонентов А и В, разделимых при помощи колоночной хроматографии на диэтиламиноэтилцеллюлозе. Каждый из компонентов в отдельности лишен активности. После соединения они катализируют три реакции, из которых состоит синтез триптофана:

- (1) индол + серин → триптофан
- (2) индолилглицерофосфат + серин → индол + триозофосфат
- (3) индолилглицерофосфат + серин → триптофан + триозофосфат

Два мутанта А1 и А3 содержат измененную форму компонента А, потерявшую способность катализировать реакции (2) и (3), но зато сохранившую каталитическую активность по отношению к реакции (1). Одновременно белки этой формы способны нейтрализовать антитела анти-А. Мутанты А2 и А4 вообще не содержат компонента А. Зато компонент В находится во всех мутантах В.

По аналогии, существуют мутанты с полным отсутствием компонента В или содержащие модификацию его структуры. Белки мутантов В1, В2 и В3 неактивны в реакциях (1) и (3), но катализируют реакцию (2) и нейтрализуют антитела анти-В. В4, В5 и В6 вообще не обнаруживают ферментативной активности ни для одной из 3 реакций и остаются серологически неуловимыми.

Путем реверсии дикого штамма, индуцированной ультрафиолетовыми лучами, были получены штаммы, полностью или частично независимые от наличия триптофана в питательной среде.

Эти кажущиеся реверсии оказались, по существу, новыми мутациями в области локуса, ответственного за синтез триптофана. Однако, репродуцируемый фермент отличался нефизиологическими удельными активностями в 3 вышеприведенных реакциях. При этой „реверсии“ образовалась новая серия модифицированных, но ферментативно активных компонентов (белков) А-тазии, обусловленной присутствием „супрессора“ в другом локусе хромосомы. Среди мутантов, два были неспособны к „реверсии“ и совершенно не содержали компонентов А и В. Генетический анализ указал на вероятный дефект в соответствующем сегменте хромосомы, управляющем синтезом фермента.

Весьма интересны примеры генетической регуляции ферментативной активности ацетилхолинэстеразы (155—157). В Канаде 1 человек на 3000—10000 отличается резко измененной ацетилхолинэстеразой, а 1 на 30 — ферментом на границе между физиологией и патологией. Патологический тип характе-

ризуется низкой активностью по отношению к бензоилхолину, используемому в качестве субстрата, более, чем 10-кратным ростом константы Михаэлиса для этого субстрата и пониженной чувствительностью к ингибиторам. Средний тип обладает более низкими ингибиторными показателями для торможения фермента.

Оказалось, что оба вида фермента, т.е. патологическая и средняя формы, одинаково чувствительны к тем ингибиторам, которые специфически реагируют с местом, связывающим сложные эфиры в ферменте (например к тетраэтилпирофосфату). Зато ингибиторы, конкурирующие с катионным атомом N в холине ацетилхолина действуют иначе по отношению к анионной группе, связывающей субстрат в ферменте. Они дают кинетику типа конкурентного торможения по отношению к сыворотке, содержащей патологический фермент и не являются конкурентными ингибиторами по отношению к физиологической сыворотке. Эти наблюдения указывают на отсутствие анионной группы в патологическом ферменте, связывающей ингибитор в физиологическом ферменте.

Семейные исследования показали, что существование двух форм ацетилхолинэстеразы детерминировано 2-мя аллелями, находящимися в одном локусе, причем особи со средней формой, по-видимому, являются гетерозиготами.

Имеется ряд других примеров, свидетельствующих о том, что замена одного аллеля другим вызывает изменения в структуре зависящего от него фермента. „Мутированные“ ферменты подвергались фракционированию и очистке. Генетически обусловленные изменения могут относиться к каталитическому центру фермента, что находит отражение в изменении его сродства к субстрату (разницы в K_s и K_m) или изменении энергии активации комплекса фермент-субстрат. Изменение чувствительности к повышенным температурам является следствием изменений вторичной и первичной структур молекулы фермента. В одном случае результатом мутации (158) была складчатость пептидной цепи, маскировавшая каталитический центр. Подогревание неактивного фермента восстанавливало его активность.

Мутации влияют также на процесс индукции синтеза фермента, детерминирующий количество фермента, образуемое в данных условиях. Есть наблюдения, указывающие на производство, в результате мутации, ингибитора фермента, что косвенным образом влияет на активность последнего.

Описаны случаи, в которых значительное уменьшение активности было последствием мутаций в нескольких местах, даже не сопряженных между собой (159). Есть предположение, что хромосома имеет несколько мест, различным образом поддерживающих процесс синтеза ферментного белка, и тем самым влияющих на его активность.

Вообще мутации, выражающиеся резким изменением активности фермента, специфичны для определенных ферментов (160, 161). Гипотеза, предшествующая этой главе, согласно которой структура отдельных ферментов детерминруется одиночными генетическими локусами, нуждается в пересмотре в связи с явлением взаимного дополнения аллелей из разных локусов при синтезе фермента (162).

Это явление указывает на факт, что не все ферменты находятся в прямой зависимости от генетического локуса. Это объясняется репродукцией генетической информации, содержащейся в локусе в форме однозначной структуры подъединицы белка, из которых состоит большинство ферментов. Такое взаимное дополнение аллелей, расположенных в разных локусах, было выявлено в процессе образования форм человеческого гемоглобина или триптофан-синтетазы из *E. coli*, белок которых состоит из неодинаковых подъединиц, находящихся под управлением генетически разных локусов. Взаимное

дополнение частями контролируемые разными локусами должно дать физиологические ферменты, дополнение частями одного и того же локуса может вызвать соединение тождественных подъединиц; в таких условиях может образоваться дефективный или патологический фермент.

Гипотеза генетической детерминации структуры белков допускает, что только наследственное вещество, т.е. гены, несет ответственность за структуру и активность ферментов. Однако, давно уже известно, что синтез определенных ферментов может стимулироваться или тормозиться специфическими факторами окружающей среды, доказательством чего являются результаты опытов на микроорганизмах в случаях т.н. ферментативной адаптации.

Под ферментативной адаптацией, в точном смысле слова, подразумевается равнодействующая двух противоположных эффектов: а) эффекта индукции, т.е. стимулирования синтеза фермента химическим соединением, которым, как правило, является субстрат или его структурный аналог; б) эффекта репрессии, т.е. торможения синтеза фермента специфическим химическим соединением, которым почти всегда бывает продукт реакции или его аналог.

В отличие от механизма мутации генов, эффект индукции синтеза фермента происходит на другом организационном уровне, а именно там, где клеточный аппарат синтеза белка переписывает генетическую информацию. Транскрипция генетической информации с ДНК на белки требует структурного посредника или „посыльного“ для переноса биохимического шифра на цитоплазму (рибосом). Необходимо знать, где происходит индукция синтеза ферментов, на генетическом или на цитоплазматическом уровне.

Кинетика явлений индукции и репрессии указывает на то, что их действие сравнимо с действием диссоциирующего активатора или ингибитора, исследуемым в ферментной системе *in vitro*. Иммунологические исследования и опыты с изотопами доказали, что индукция низкомолекулярными химическими соединениями обуславливает весьма эффективный и полный синтез ферментного белка из аминокислот (163, 164). Анализ эффекта индукции со стороны влияния субстратов (метаболитов) и продуктов реакции на максимальную скорость реакции V и K_m обнаружил количественную зависимость между метаболитом и эффектом индукции или репрессии.

Механизм и специфичность действия метаболитов оказались независимыми от активности, а тем самым и от структуры индуцируемых или тормозимых ферментов. Стало быть, они не могут специфическим образом влиять на синтез одиночных ферментов, но возможно, что они способны регулировать синтез многих ферментов одновременно, действуя на метаболическом уровне, общем для генетической регуляции синтеза белка.

Эти процессы наглядно представлены в схеме Jacob и Monod (165, 166), (рис. 27), авторов следующей гипотезы:

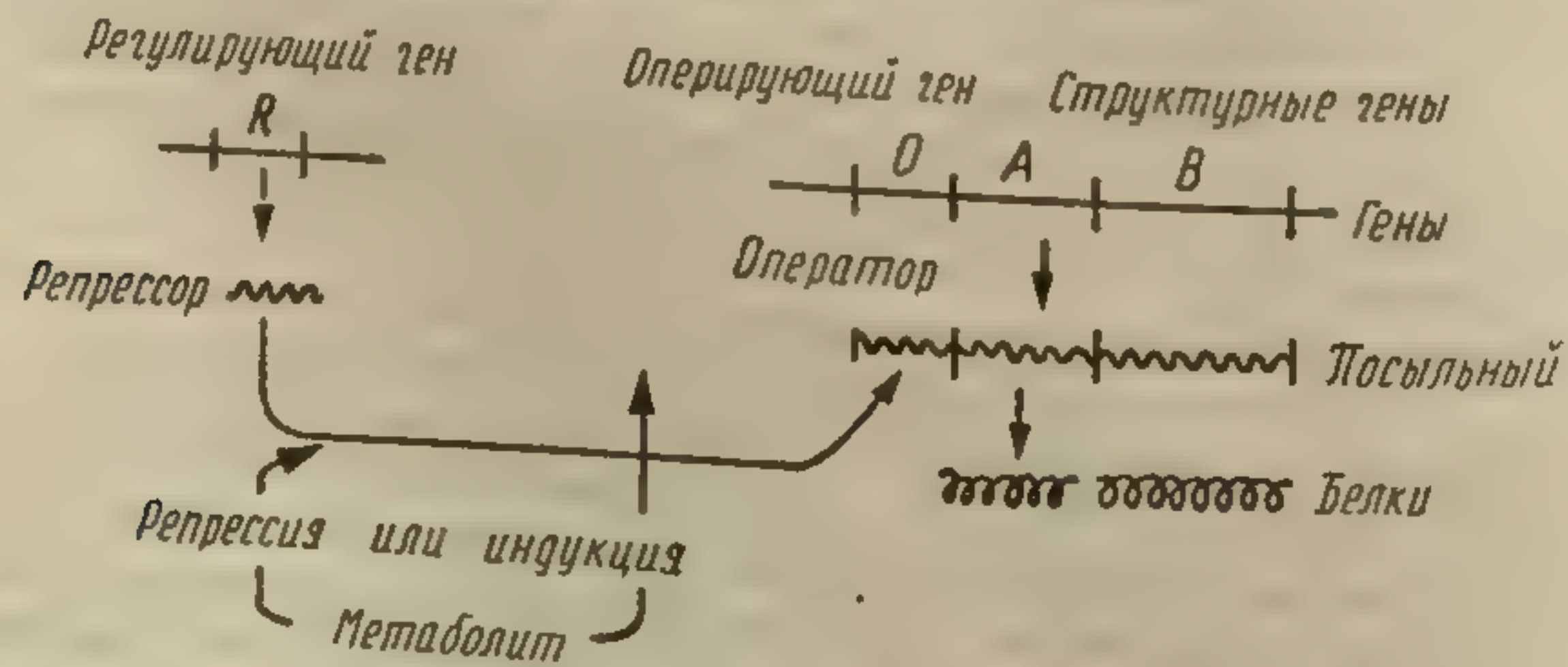


Рис. 27. Генетическая регуляция синтеза белков (Jacob и Monod, 1961).

Специфичность индуктивного и репрессивного действий независима от строения ферментных белков. Это строение детерминировано совокупностью генов, т.н. структурных. Кроме этих генов есть регулирующий ген, который влияет на размеры синтеза фермента, если синтез индуцируется или подавляется (репрессия) посредством цитоплазматических веществ, синтезируемых под его управлением.

Репрессор или метаболит, тормозящий синтез специфического фермента, сотрудничает с оперативным геном на уровне „посыльного“ генетической информации, или по прямому пути. Специализированный „посыльный“ оперативного гена, иначе называемый оператором, соединяется с репрессором, вследствие чего подавляется синтез фермента.

Этот вывод основан на многочисленных опытах из области генетики и биохимии (167). Предполагается, что один и тот же оператор может одновременно переносить информацию от ряда генов к ряду белков. Индукция или торможение синтеза ферментов может в таком случае состоять в реакции между оператором и метаболитами ферментативных реакций.

Структурные гены, находящиеся, под управлением оперативного гена, обычно сгруппированы и образуют функциональную единицу. Jacob и Monod рекомендуют назвать эту единицу опероном. Действие репрессора на уровне оперативного гена состоит в том, что оператор, соединившись с репрессором, перестает действовать, в результате чего подавляется синтез фермента. Если оператор свободен, перенос структурной информации и индукция фермента происходят беспрепятственно.

Структурная информация переносится со структурных генов на цитоплазматические синтезирующие центры в микросомах посредством растворимой рибонуклеиновой кислоты, которая отличается весьма быстрым обменом. Это и есть упомянутый выше „посыльный“, переносящий информацию, объект деятельности индукторов и репрессоров.

Анализ явлений ферментной адаптации выявил основной факт. Оказывается, что бактериальный геном содержит не только планы структуры ферментов, но и программу осуществления их синтеза и средства, обеспечивающие контроль над ходом синтеза.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН ВЕЩЕСТВ

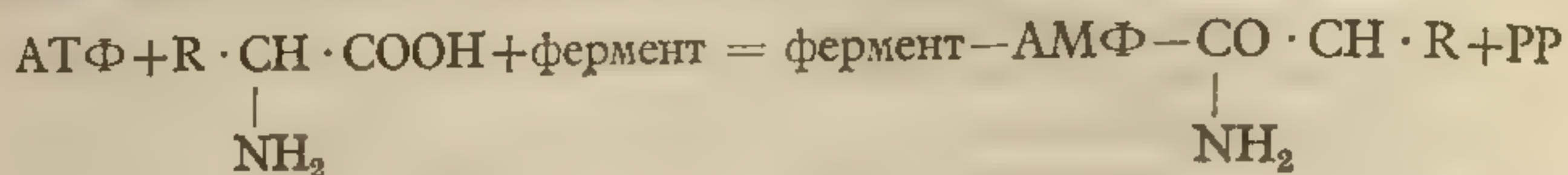
ОБМЕН БЕЛКОВ И АМИНОКИСЛОТ

Все белки в животном организме постоянно обновляются за счет своих предшественников; иначе говоря, они пребывают в состоянии динамического равновесия. Это было доказано опытами с включением аминокислот, меченных изотопами ^{14}C , ^2H и ^{15}N . Есть разница в скорости обновления между отдельными видами белков в органах, где происходит их синтез *de novo*.

Наряду с непрерывным синтезом новых молекул белка происходит их распад на аминокислоты под влиянием внутриклеточных пептидогидролаз (протеолитических ферментов). В организме существует фонд свободных аминокислот, в котором смешиваются аминокислоты, освобождаемые при распаде белка, с аминокислотами алиментарного происхождения, а также с аминокислотами, происходящими из жирных кислот и других предшественников. Однако, организм способен синтезировать только некоторые аминокислоты, т.н. эндогенные. Остальные поступают с пищей, и синтез белка зависит от их подвоза.

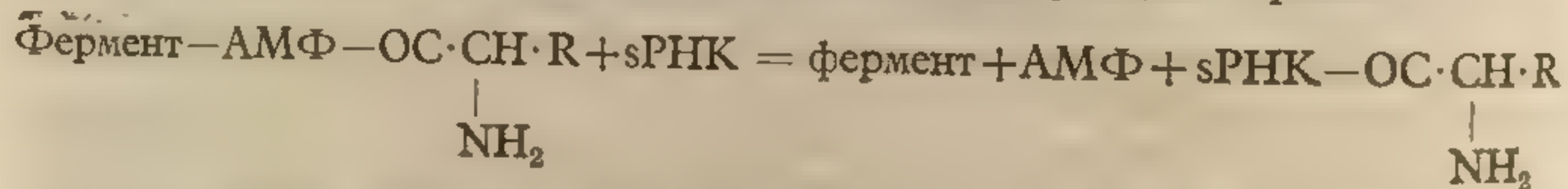
БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Каждый процесс биосинтеза требует затраты энергии, освобождаемой при распаде высокоэнергетических соединений, в особенности нуклеозидтрифосфатов. Для того, чтобы аминокислоты могли образовать пептидную цепь, они должны быть переведены в активную форму, находящуюся на более высоком энергетическом уровне. Такая активация происходит путем реакции карбоксильной группы с АТФ и катализируется ферментами типа трансфераз (киназ), специфическими для отдельных аминокислот. Образуются высокоэнергетические аденилаты аминокислот, связанные со специфическим белком:



Активированные аминокислоты соединяются, соблюдая последовательность, свойственную данному роду белка и виду животного. Это происходит в соответствии с генетической информацией, пересылаемой из клеточного ядра в место, где происходит синтез белка, т.е. в микросомы (рибосомы). Передатчиком аминокислот является т.н. растворимая рибонуклеиновая кислота (sРНК), состоящая приблизительно из 90 нуклеотидов.

Ферменты, активирующие индивидуальные аминокислоты, выполняют двоякую функцию. Они не только переводят кислоты в реактивную форму, но и переносят аминокислотные остатки на концевой аденозиновый остаток, находящийся всегда на конце полипептидной цепи sРНК, с освобождением АМФ. Этот этап реакции можно представить следующим образом:



Присоединение активной аминокислоты происходит по типу образования сложного эфира со свободной гидроксильной группой рибозы.

sРНК имеет специфическую последовательность нуклеотидов, что и определяет, какая аминокислота будет присоединена, благодаря избирательному сродству с данным активирующим ферментом.

Сложный эфир аминокислота-sРНК перемещается по направлению к рибосоме, в которой из этих соединений образуется структура комплементарная к полинуклеотидной матрице. Очередность полимеризации низкомолекулярной sРНК в высокомолекулярную рибонуклеиновую кислоту рибосомы генетически детерминирована. Результатом этой полимеризации является установка реактивных аминокислотных остатков в линейном порядке, согласно генетическому плану.

Последней фазой биосинтеза белка является соединение реактивных карбоксильных групп с аминогруппами соседних аминокислот на рибосомной матрице. Это катализируемый процесс, приводящий к образованию полипептидной цепи, отделяющейся от полипептидной спирали, к которой она прилежала. Катализатором этого процесса служит белок, содержащий активные SH-группы. Процесс полимеризации начинается с аминокислоты со свободной аминогруппой. Образованная пептидная цепь со специфической аминокислотной последовательностью спонтанно принимает спиральную или складчатую форму, в соответствии с силами многочисленных связей, характерных для этой последовательности. Так возникают вторичная и третичная структуры.

После укомплектования аминокислот в пептидные цепи, освобождается sРНК и заново служит для переноса активной аминокислоты. Эта роль соответствует функции кофермента, а весь процесс имеет циклическую форму.

РАСПАД БЕЛКА

В клетках находятся многочисленные пептид-гидролазы (протеолитические ферменты), разлагающие специфическим образом высокомолекулярные белки на пептиды (катепсин В и С). Их дальнейший распад происходит под влиянием аминопептидаз и карбоксипептидаз, последовательно отрывающих свободные аминокислоты у обоих концов пептидной цепи. Часто протеолитический процесс требует толчка в виде расслабления третичной структуры молекулы, что дает протеолитическим ферментам возможность действовать (например разрывать мостики S—S).

Вследствие распада белка в клетке образуется смесь аминокислот, которые частично используются для синтеза новых молекул белка, а частично, течением тканевых жидкостей и крови, распределяются по разным органам и тканям.

ОБМЕН АМИНОКИСЛОТ

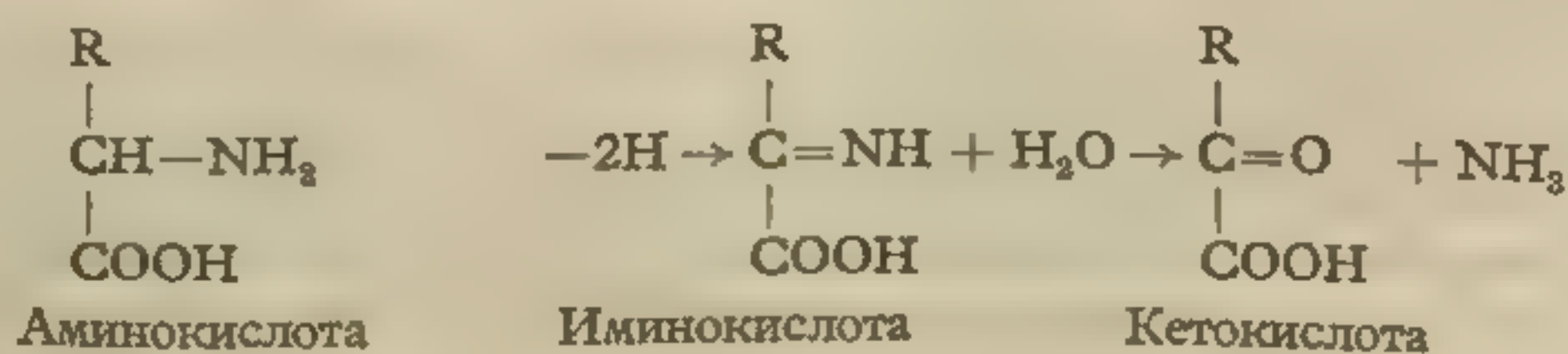
Судьбы аминокислот в организме различны. В основном они служат для синтеза белка. Кроме того, части пептидной цепи и химические группировки аминокислот используются для синтеза небелковых соединений, или же переходят в экскреторные продукты. Особого внимания заслуживают превращения, которым подвергаются карбоксильная группа, аминогруппы и боковая цепь отдельных аминокислот, так как эти группы можно метить изотопами и находить среди метаболитов.

Аминогруппа каждой из аминокислот может быть перенесена на определенные кетокислоты. Эту реакцию катализируют ферменты, переносящие аминогруппы, т.е. аминотрансферазы. Их необходимым коферментом является пиридоксальфосфат, осуществляющий перенос этой группы. Механизм переноса описан в главе о коферментах (стр. 16).

Главными, в количественном отношении, акцепторами аминогрупп служат щавелевоуксусная и 2-кетоглутаровая кислоты, образующиеся в цикле лимонной кислоты. Источником обеих кетокислот является обмен сахаров и жиров в этом цикле. Это обеспечивает биосинтез глутаминовой и аспарагиновой кислот. Пировиноградная кислота, метаболит сахарного обмена, может получить аминогруппу от глутаминовой кислоты, в присутствии соответствующей аминотрансферазы. В данном случае образуется аланин.

Аспарагиновая и глутаминовая кислоты являются, в количественном отношении, главными донорами аминогрупп для реакций трансаминирования. В принципе, все эндогенные аминокислоты получают аминогруппы посредством дикарбоновых аминокислот, которые, со своими амидами, глутамином и аспарагином служат главным источником аминогрупп и связанного аммиака для организма.

Отрыв аминогруппы аминокислот совершается путем кислородного дезаминирования, в соответствии с общим уравнением реакции



Кислородному декарбоксилированию аминокислот с разветвленной цепью предшествует их дезаминирование. Процесс декарбоксилирования протекает аналогичным образом. Дальнейшими продуктами реакции являются ацетоуксусная кислота (лейцин, изолейцин) и метилмалоновая кислота (из валина), а их превращения связаны с метаболизмом разветвленных жирных кислот, зависимым от КоА и специфических ферментов.

Превращения ароматических аминокислот, подробно представленные в метаболической таблице, ведут к конечным продуктам, ацетоуксусной и фумаровой кислотам. Это ряд реакций, в состав которых входят гидроксилирование, трансаминирование, окисление и гидролиз. Попутно происходит кислородный разрыв бензольного ядра посредством гомогентизинатоксигеназы. Гомогентизиновая кислота является предшественником темного пигмента, который находится в моче при алкаптонурии. Это явление обусловлено метаболическим блоком, образующимся по генетическим причинам в этом месте и вызывающим накопление гомогентизиновой кислоты.

Из тирозина образуется адреналин, диiodтирозин, а также йодированные производные тиронина (гормоны щитовидной железы) и меланины волос и кожи.

Превращение триптофана через серию промежуточных реакций ведет к появлению никотиновой кислоты, которая частично удовлетворяет потребность организма в витамине РР и является предшественником в синтезе пиридиновых коферментов.

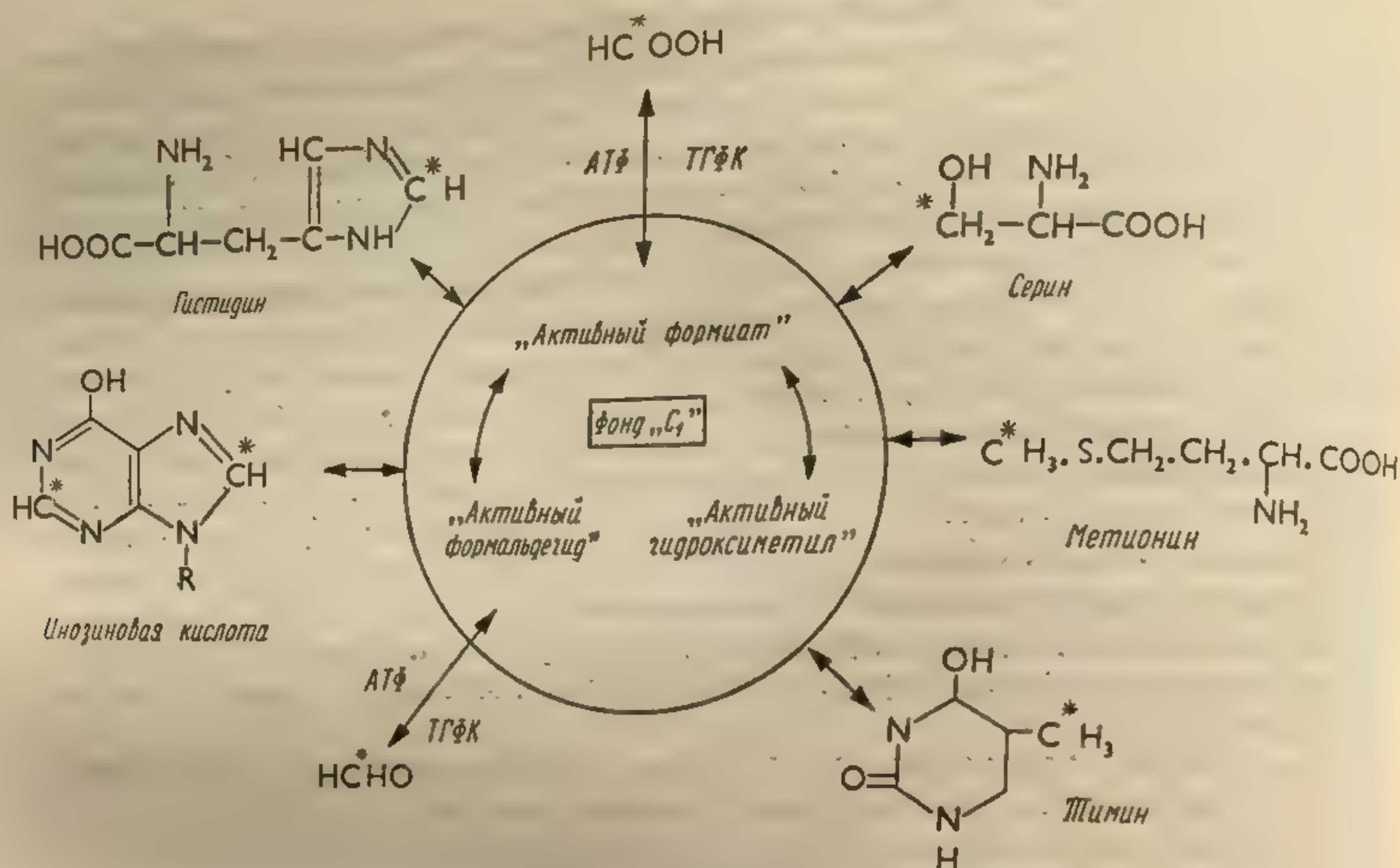
Аргинин, пролин и гистидин переходят в глутаминовую кислоту. Помимо того, аргинин, под влиянием аргиназы, может прямо переходить в мочевины. При распаде гистидина возникает „активный формиат“, т.е. одноуглеродный фрагмент разорванного имидазольного ядра. „Активный формиат“ является формилпроизводным тетрагидрофолиевой кислоты, кофермента формилтрансфераз (см. главу о коферментах, стр. 25). Ферменты, переносящие формильные группы, играют важную роль при биосинтезе пуринового ядра, а также серина и глицина. Следовательно, эти синтезы зависят от витаминов из группы фолиевой кислоты. Для превращения серина в глицин необходим также пиридоксальфосфат.

ОБМЕН ОДНОУГЛЕРОДНЫХ ФРАГМЕНТОВ

К ним принадлежат „активный формиат“, „активный формальдегид“, т.е. активные формильная и гидроксиметильная группы. Последняя является прямым предшественником метильной группы. Своей реактивностью они обязаны соединению с простетической группой ферментов типа трансфераз (гидроксиметилтрансфераза, формилтрансфераза, формиминотрансфераза), являющейся тетрагидрофолиевой кислотой (см. глава о коферментах, стр. 25). Организм располагает фондом одноуглеродных фрагментов, используемых при синтезе пуринового ядра, имидазольного ядра гистидина, и бета-углерода серина. Кроме того, этот фонд является эндогенным источником метильных групп для метионина, который в свою очередь служит донором этих групп в реакциях биологического метилирования.

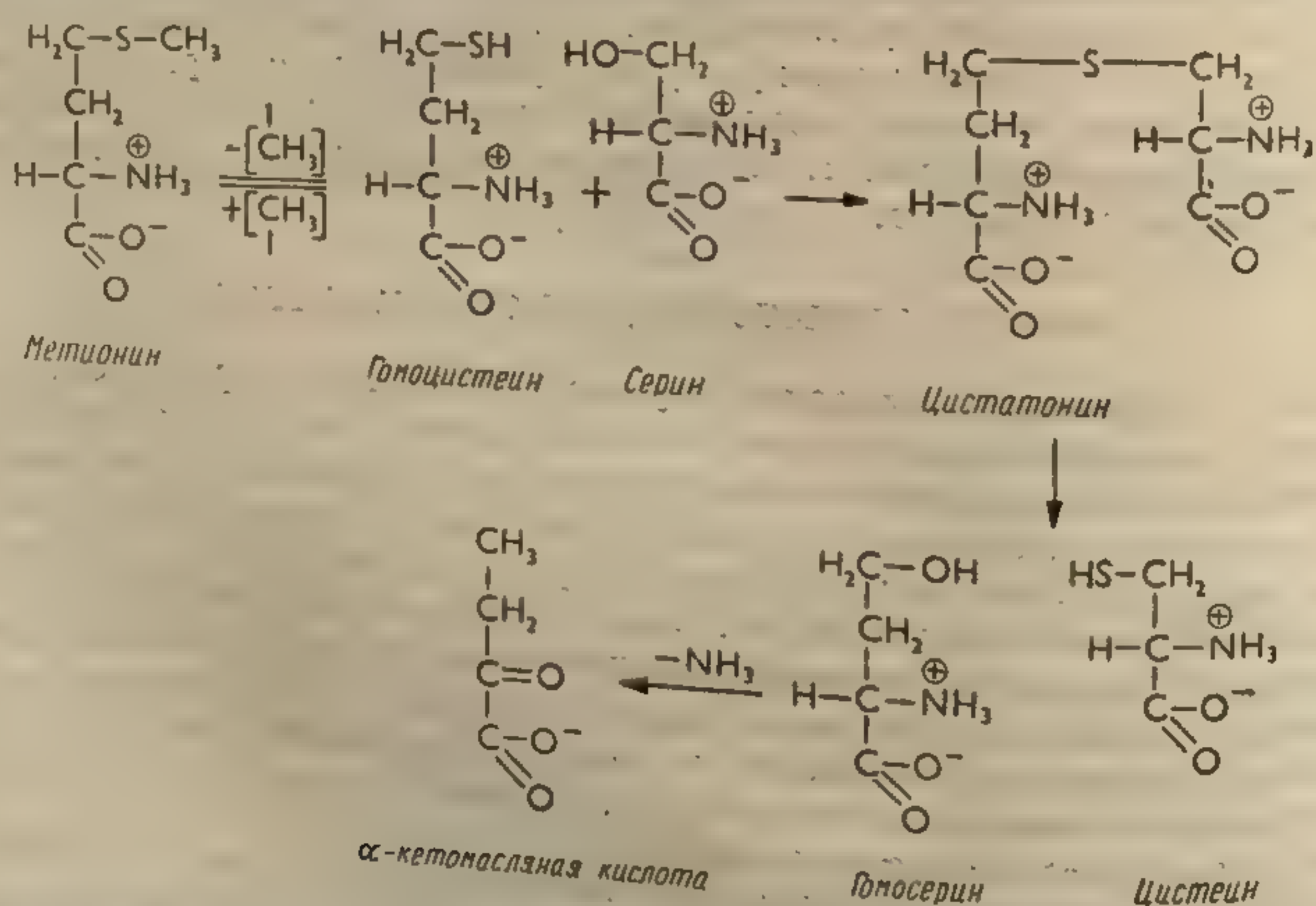
Расположение одноуглеродных фрагментов в метаболическом процессе изображено на схеме, составленной на основании опытов с изотопами. Звездочка означает меченный углерод.

Авитаминоз типа дефицита фолиевой кислоты препятствует внедрению радиоактивных формиатов и формальдегида в упомянутые соединения, или их синтезу. Тот же эффект вызывается аминоптеринном и аметоптеринном, антагонистами фолиевой кислоты; Механизм их действия состоит в неконкурент-

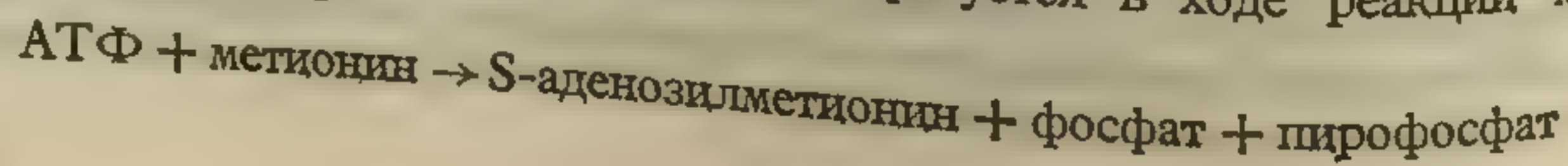


Обмен одноуглеродных фрагментов (ТГФК — тетрагидрофолиевая кислота)

ном торможении редуктазы дигидрофолиевой кислоты, что в свою очередь подавляет образование тетрагидрофолиевой кислоты (ТГФК), необходимого кофермента для переноса одноуглеродных фрагментов.



Метильная группа, необходимая для метилирования, встречается в активной форме в виде соединения аденозина с метионином (аденозилметионин, см. стр. 31). Это соединение, которое образуется в ходе реакции между метионином и АТФ



весьма реактивно и может быть метилирующим фактором. В этой форме метильная группа используется для синтеза креатина или для метилирования цитозина в тимин и коламина в холин.

Метионин переходит, после отдачи реактивной метильной группы, в гомоцистеин. При реакции конденсации с серином образуется цистатионин, который распадается на гомосерин и цистеин. Конденсация катализируется фосфопиридоксальпротеидом, называемым цистатионсинтетазой.

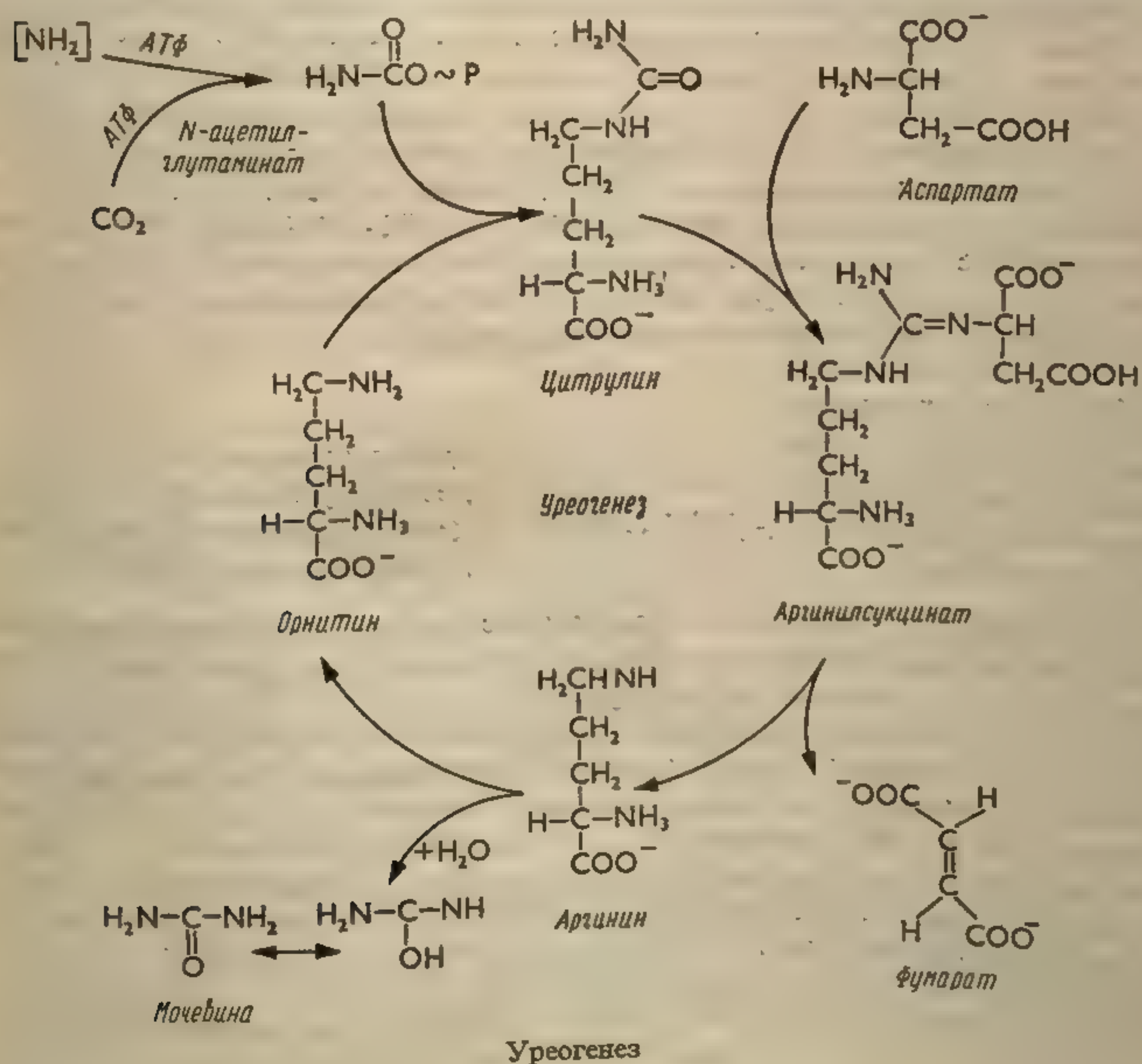
Метионин является необходимой аминокислотой. Исключение этого вещества из пищи создает необходимость и в доставке цистеина, принадлежащего к эндогенным аминокислотам.

Цистеин подвергается кислородному разложению, через этап цистеиновой кислоты, вплоть до пировиноградной кислоты и сульфата. Подобным же образом проходит разложение цистеина с отщеплением H_2S и аммиака, катализируемое цистеинтранссульфгидразой. В этом случае также образуется пировиноградная кислота.

Треонин разлагается под влиянием треонинальдолазы (почка, печень) на глицин и ацетальдегид. Он может также окисляться в 2-кетомасляную кислоту.

ЦИКЛ МОЧЕВИНЫ

Этот цикл представляет замкнутую цепь реакций, играющих центральную роль в процессе удаления из организма избытка аминогрупп под видом мочевины. Особенностью цикла является то обстоятельство, что каждый из



его метаболитов каталитически стимулирует производство мочевины из любого количества предшественников. Уровень метаболитов цикла постоянен, но он зависит от подвоза аспарагиновой кислоты, которая одновременно превращается в фумаровую кислоту.

Одна из аминогрупп мочевины происходит из глутаминовой кислоты, вторая — из аспарагиновой. Так как все аминокислоты могут путем трансаминирования передавать аминогруппы двум упомянутым дикарбоновым аминокислотам, то аминный азот белка именно этим путем переходит в экскреторный продукт.

Аминогруппа глутаминовой кислоты реагирует с бикарбонатом и с АТФ, образуя карбамилфосфат. Орнитинкарбамилтрансфераза переносит карбамильную группу на δ -аминогруппу орнитина. Образуется цитрулин и неорганический фосфат.

В следующей реакции цитрулин соединяется с активированным при помощи АТФ аспаратом в аргинилсукцинат. Это соединение расщепляется аргинилсукцинатлиазой на фумаровую кислоту и аргинин. В ходе последней реакции цикла аргиназа гидролизует аргинин на мочевину и орнитин.

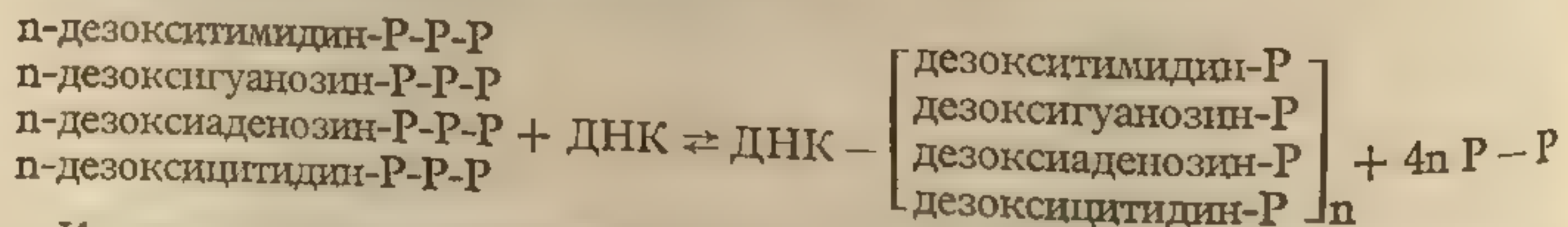
ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

БИОСИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Биосинтез дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и рибонуклеиновой кислоты (РНК) происходит в клеточном ядре. Он связан с синтезом цитоплазматических белков, причем он опережает и обуславливает этот процесс.

Синтез нуклеиновых кислот обусловлен наличием малых количеств ДНК или РНК в качестве фактора, начинающего реакцию полимеризации нуклеотидов (матрица). Синтез ДНК, по существу, является пирофосфоролизом трехзамещенных нуклеозидфосфатов. К концу полинуклеотидной цепи присоединяются в генетически запланированной последовательности нуклеотиды. При этом отщепляются пирофосфатные остатки. Разрыв одной из двух пирофосфорных связей у трехзамещенных фосфатов обеспечивает свободной энергией процесс полимеризации.

Общая схема реакции:



Кроме матрицы, необходимо присутствие всех 4 родов трехзамещенных нуклеозидфосфатов и полимеризующего фермента типа трансферазы, называемого ДНК-нуклеотидил-трансферазой.

Синтез новой полинуклеотидной цепи происходит на одном из концов двойной спирали комплементарным способом, детерминированным последовательностью нуклеотидов этой цепи. Комплементарность вытекает из принципа попарного сочетания пуриновых и пиримидиновых оснований, в соответствии со схемой: аденин-тимин и гуанин-цитозин. Нарастающая в обратном направлении комплементарная цепь отличается детерминированной последовательностью нуклеотидов. Образующаяся пара полинуклеотидных цепей направляется на общую ось, формируя спираль Crick.

Строение рибонуклеиновой кислоты аналогично структуре ДНК, с той только разницей что она представляет полимер нуклеотидов, а не дез-

оксинуклеотидов. Она встречается в рибосомах в соединении с белком. Ее синтез происходит преимущественно, если не исключительно, по соседству с хромосомами, после чего РНК распространяется по плазме и принимает вид субмикроскопической зернистости, рибосом.

Механизм полимеризации рибонуклеотидов в РНК существенным образом отличается от механизма синтеза ДНК. На матрице РНК происходит присоединение нуклеотидов путем фосфоролита нуклеозидфосфатов, в соответствии с общим уравнением реакции:



Фермент, выделенный из микроорганизмов, называется полинуклеотидфосфорилазой.

РАСПАД НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

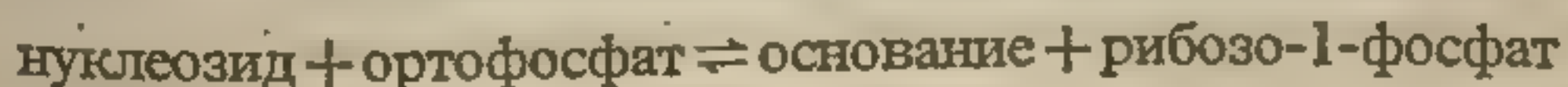
Высокомолекулярные нуклеиновые кислоты могут разлагаться путем обратного процесса пирофосфоролита или фосфоролита. На сегодняшний день, однако, положения равновесия реакции и механизмы распада недостаточно изучены.

Есть более точные сведения о разложении нуклеиновых кислот ферментами поджелудочной железы, деполимеризующими ДНК и РНК. Это дезоксирибонуклеаза и рибонуклеаза. Первый из этих ферментов является гидролазой, разрывающей сложноэфирные связи между C'_3 дезоксирибозы и фосфорной кислотой нуклеотидов. В зависимости от рода фермента, разрываются те или другие связи. В селезенке и других тканях находится фермент, гидролизующий 5'-фосфатные связи.

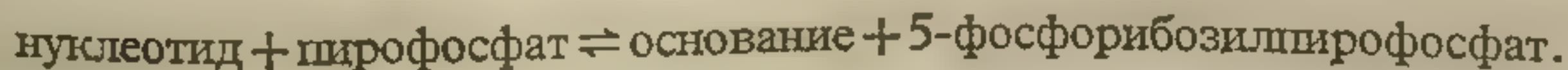
Рибонуклеаза представляет собой трансферазу, переносящую фосфатную группу из положения 5'-нуклеотида или пиримидиннуклеотида в положение 2' соседнего пиримидиннуклеотида. Образуется циклический 2',3'-нуклеотид, который гидролизует на 3'-нуклеотид. Под влиянием рибонуклеазы образуются олигонуклеотиды с фосфатом в положении 3'. Окончательным результатом является деполимеризация РНК на небольшие фрагменты, т.е. олигонуклеотиды.

Дальнейший распад происходит под влиянием неспецифических гидролаз, атакующих эфирные фосфатные связи, типа фосфодиэстеразы и фосфомоноэстеразы. Диэстеразы отрывают мононуклеотиды от олигонуклеотидов, а моноэстеразы превращают их в нуклеозиды. Диэстеразы атакуют 3'-эфирную связь, в результате чего образуются нуклеозид-5'-фосфаты. Последние, в свою очередь, разлагаются 5'-нуклеотидазой.

Главный путь разложения нуклеозидов подчиняется фосфоролитическому или пирофосфоролитическому механизму. В присутствии специфических трансфераз реакция протекает по общей схеме:



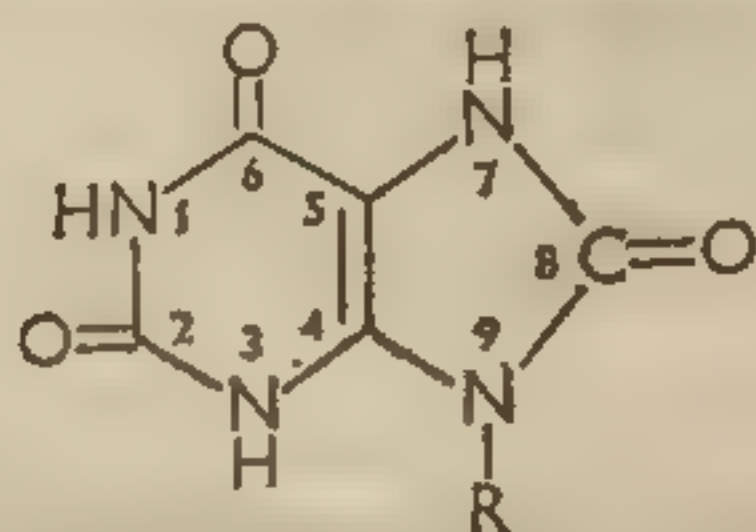
или



Эти реакции практически обратимы, и в их ходе могут образоваться новые нуклеозиды посредством обмена пуриновых или пиримидиновых оснований.

БИОСИНТЕЗ ПУРИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

Опыты с изотопами показали, что нуклеотиды образуются в ходе тотального биологического синтеза, а не из пуриновых и пиримидиновых оснований через фазу нуклеозидов. Предшественниками пуринового ядра являются глицин, глутамин и аспарагиновая кислота. Помимо того, некоторые углероды пуринового ядра происходят из активного формиата (C_2 и C_8), а также из CO_2 (C_6). Углероды C_4 и C_5 относятся к глицину. Азот глицина образует N_7 , амидазот глутамина — N_3 и N_9 , а аминогруппа аспарагиновой кислоты дает N_1 .



Мочевая кислота

Синтез начинается активацией рибозо-5-фосфата ферментом, обнаруженным в печени и названным рибозофосфат-пирофосфокиназой. Это трансфераза, переносящая пирофосфатную группу с АТФ в положение C_1 рибозо-5-фосфата. Образующийся 5-фосфорибозопирофосфат (ФРПФ) реагирует поочередно с глутамином и глицином в двух реакциях. Первая из них катализируется специфической трансферазой. В ходе второй присоединяется остаток глицина под влиянием специфической лигазы. В результате образуется глицил-амидриботид.

Затем к боковой цепи рибозы присоединяется формильная группа, перенесенная формилированным коферментом ТГФК („активный“ формальдегид) с доноров этой группы (м.пр. с серина). Фермент, которому принадлежит этот кофермент, является специфической формиминотрансферазой.

Введение второй аминогруппы из глутамина происходит в присутствии АТФ и специфической лигазы (синтетазы). Формилглициламидинная цепь замыкается в кольцо; таким образом возникает имидазольное кольцо, замещенное в положении 5'-аминогруппой, и присоединившее в положении 1' 5-фосфорибозильный остаток.

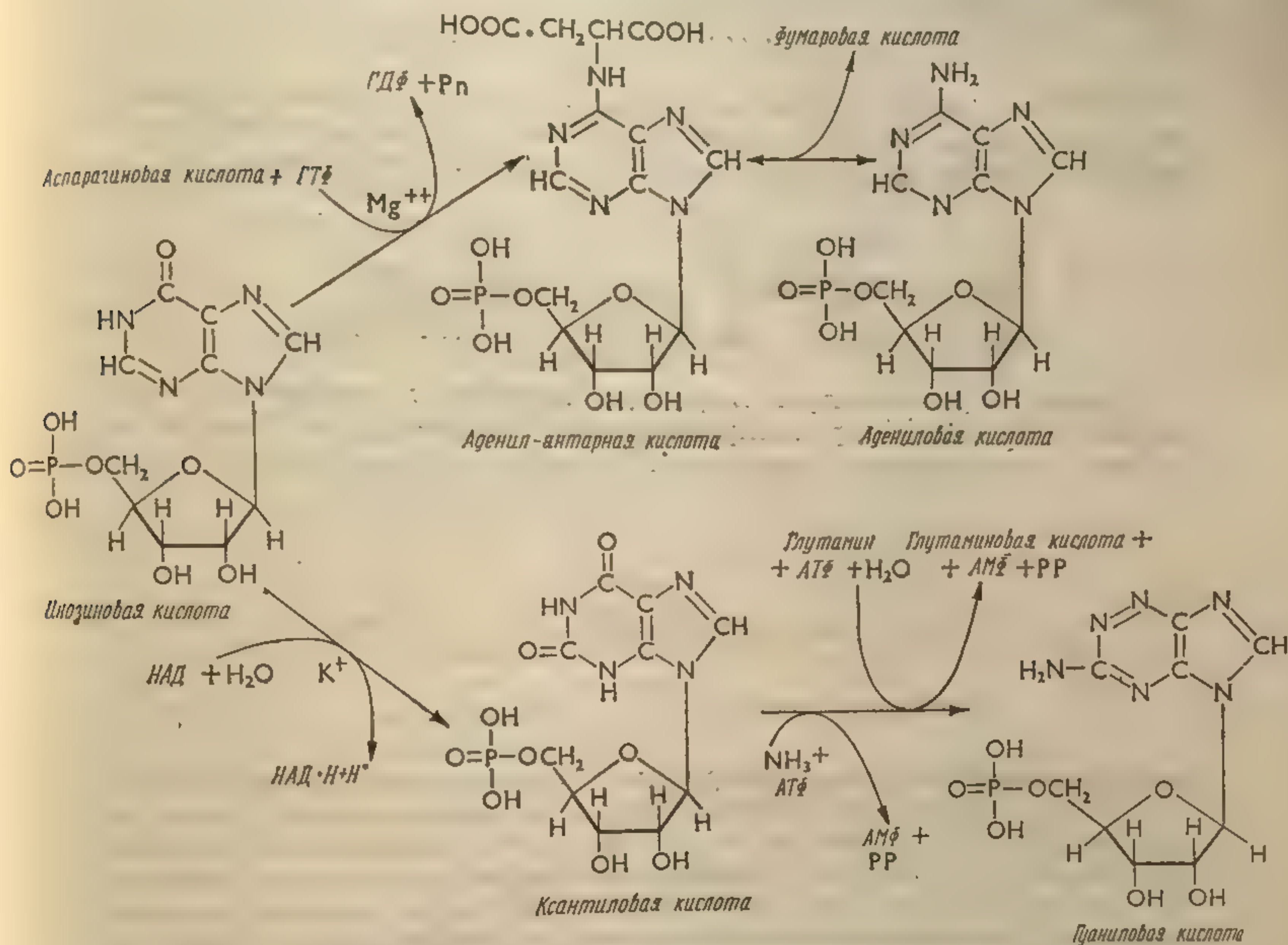
Под влиянием специфической карбоксилазы вводится группа CO_2 в положение 4' имидазольного ядра, а затем к ней присоединяется остаток аспарагин-трансферазой. Расход энергии покрывается за счет распада АТФ на АДФ. После отрыва фумаровой кислоты остается 5-фосфорибозил-5'-амино-4'-имидазолкарбоксамид. Это и есть то соединение, которое было изолировано из бактериальных культур, тормозимых сульфонидами, и которое позволило исследователям выявить механизм синтеза нуклеотидов.

Очередное трансформилирование аминогруппы в положении 5' дает соединение, являющееся прямым предшественником инозиновой кислоты, так как выделение молекул воды смыкает в кольцо боковые цепи в положении 4' и 5' и образует пуриновое ядро.

Ознакомление с приведенными выше промежуточными реакциями имеет большое практическое значение. Особенно важно знать структуру каталитического центра некоторых ферментов. Были обнаружены ингибиторы реакции синтеза формилглициламидинриботида (как азасерин или 6-диазо-5-кето-L-норлейцин), неконкурентно тормозящие использование глутамина для этого синтеза, по принципу структурного сходства с глутамином. Они присоединя-

ются к активному центру фермента вместо субстрата. Аналоги фолцевой кислоты отличаются конкурентным действием при реакциях трансформилирования.

Биосинтез пуринов требует значительной затраты энергии. Образование 8 связей C—N влечет за собой распад не менее 5 молекул АТФ.



Образование адениловой и гуаниловой кислот

Адениловая и гуаниловая кислоты образуются из инозиновой кислоты. В присутствии ГТФ (гуанозинтрифосфата) в качестве источника энергии, и соответствующей синтетазы инозиновая кислота конденсируется с аспарагиновой кислотой и после отщепления фумарата лиазой, присоединяет аминогруппу в положении С₆.

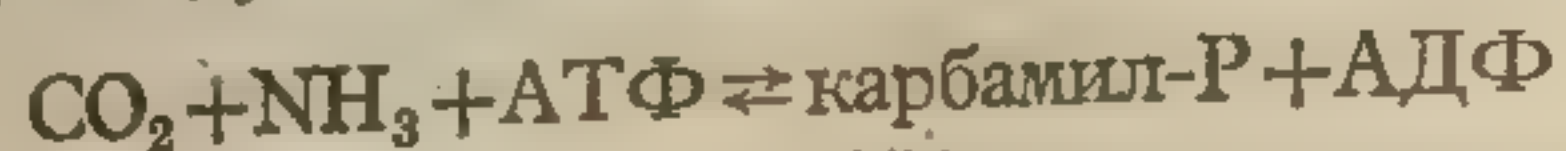
Ксантиловая кислота образуется путем окисления инозиновой кислоты принозинатдегидрогеназой. Акцептором водорода является НАД. Затем, в присутствии АТФ, амидогруппа переносится с глутамина на ксантиловую кислоту. Образуется гуаниловая кислота.

БИОСИНТЕЗ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ

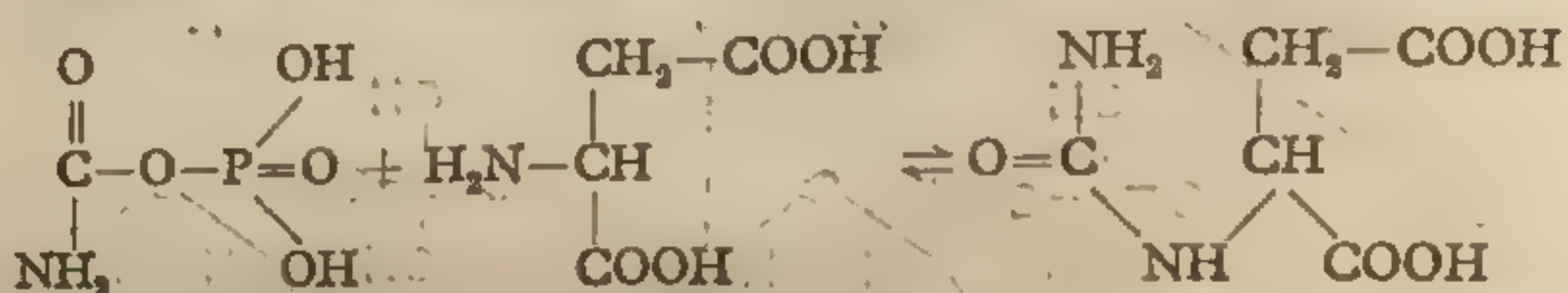
Это менее сложный процесс, чем биосинтез пуриновых нуклеотидов. Главной особенностью этого синтеза является образование оротовой (урацил-4-карбоновой) кислоты в качестве промежуточного соединения. Оротовая кислота, в свою очередь, служит акцептором рибозилфосфатного остатка.

Оротовая кислота заменяет у микроорганизмов пиримидиновые соединения, необходимые для роста. Она представляет собой метаболит процесса синтеза нуклеиновых кислот.

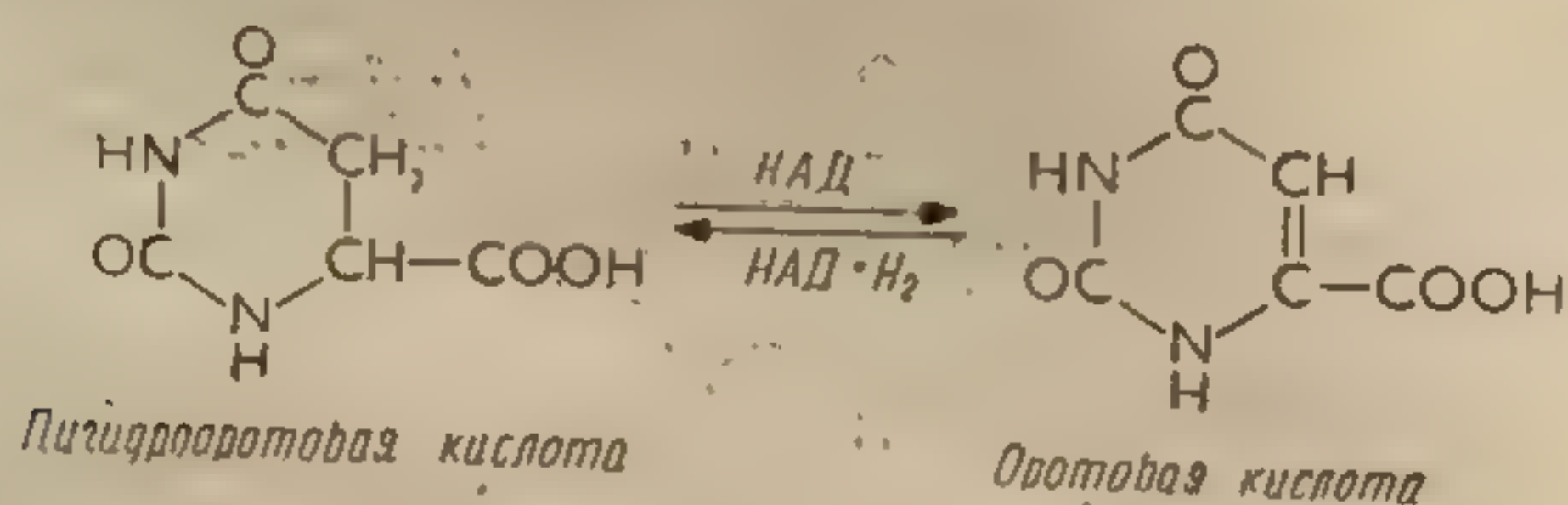
Образование пиримидинового ядра начинается с синтеза карбамилфосфата. У микроорганизмов образуется „активная“ карбамильная группа, т.е. карбамилфосфат, в ходе следующей реакции:



В животных тканях эта реакция сложнее. Она протекает подобно уреогенезу (см. стр. 115). Обратный ход реакции синтеза цитрулина, т.е. фосфорилиз цитрулина, поставляет карбамилфосфат для синтеза пиримидинов.



Карбамилфосфат реагирует в реакции переноса с аспартатом катализируемой аспартат-N-карбамилтрансферазой. Образующийся N-карбамиласпартат (уреидосукцинат) замыкается в кольцо, отдавая молекулу воды



дигидрооротовой кислоте. Дигидрооротат, в ходе реакции дегидрогенации, с НАД⁺ в качестве кофермента, в присутствии дигидрооротазы, переходит в оротовую кислоту. Оротовая кислота соединяется с 5-фосфорибозил-1-пирофосфатом (ФРПФ). При этом отщепляется пирофосфатная группа. Это типичная реакция переноса 5-фосфорибозильного остатка на акцептор, которым в данном случае является оротовая кислота. Эту реакцию катализирует специфическая трансфераза; ее тормозят аналоги оротовой кислоты, например 4-урацилсульфонамид или 4-урацилсульфонат.

В ходе описанной реакции образуется оротидин-5'-фосфат или оротидилнуклеотид. Под влиянием специфической декарбоксилазы отщепляется молекула CO_2 и образуется уридин-5'-фосфат или уридиловая кислота.

Под влиянием соответствующих киназ, уридиловая кислота (УМФ) превращается за счет АТФ в УДФ и УТФ.

Цитидин образуется в ходе реакции, катализируемой киназой. При помощи АТФ аминогруппа аммиака переносится на УТФ.

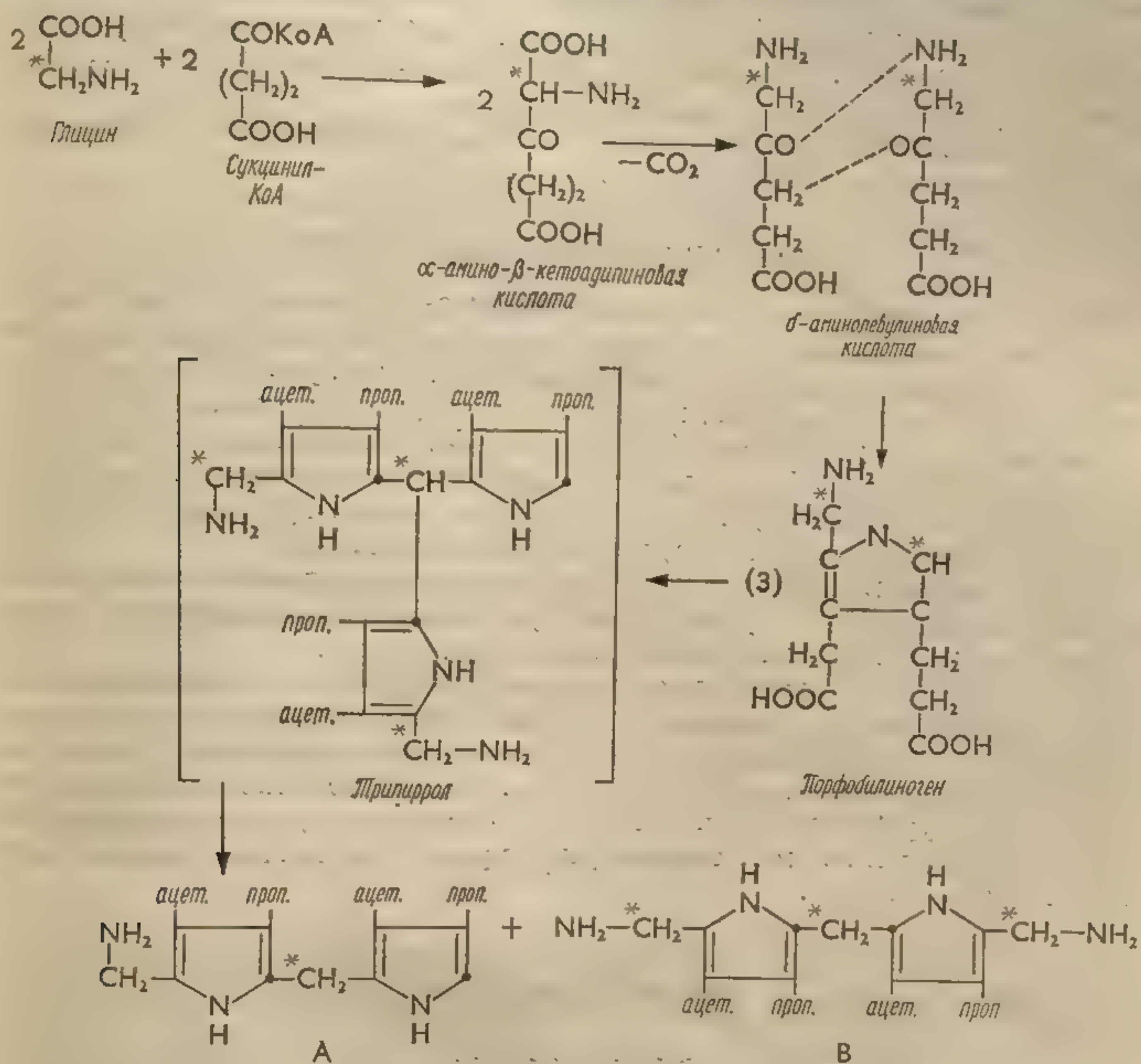
ОБМЕН ПИРРОЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ

СИНТЕЗ ПОРФИРИНОВ

Опыты с внедрением меченных предшественников в железопорфирин гемоглобина показали, что 34 атома углерода берутся из ацетата и глицина. Меченные атомы выявили существование общего предшественника для всех

4 пиррольных колец, в виде δ -аминолевулиновой кислоты. 2 молекулы конденсируются в порфобилиноген, обнаруживаемый в моче больных порфиринурией.

Поиски промежуточных соединений в этом синтезе, производимые в гемолизатах ядерных эритроцитов, синтезирующих гемоглобин, привели к открытию пути синтеза порфиринов. Синтез начинается реакцией конденсации между глицином и „активным сукцинатом“ или сукцинил-КоА. На это ука-



Биосинтез уропорфирина III (* означает меченный углерод C_{14})

зывает торможение синтеза порфирина малонатом. Образуется α -амино- β -кетoadипиновая кислота, которая путем декарбоксилирования у альфа-углерода (δ -аминолевулинат-синтетаза) переходит в δ -аминолевулиновую кислоту. Под влиянием аминолевулинат-дегидрогеназы происходит циклизация 2 молекул этого соединения в порфобилиноген, сопровождаемая отщеплением 2 молекул воды. Этот фермент находится в ядерных и безъядерных эритроцитах человека.

Путем соединения 4 молекул порфобилиногена с отщеплением 4 молекул аммиака можно получить уропорфин, содержащий 4 остатка пропионовой кислоты в качестве боковых цепей в бета-положениях порфина. При такой конденсации может образоваться только уропорфин I, патологическое вещество. Естественным предшественником протопорфирина IX является уро-

порфирин III, в котором переставлены замещающие группы в положениях 7 и 8. Поэтому приняты средние, трех- или восьмипиррольные системы, из которых образуется порфинная система с соответствующим замещением боковых групп. Об участии трипиррола в качестве посредника свидетельствует появление формальдегида во время конденсации 3 колец, что было обнаружено при помощи изотопов и ферментов.

Из уропорфирина путем декарбоксилирования 4 остатков уксусной кислоты образуется копропорфирин. Затем дегидрогенация и декарбоксилирование остатков пропионовой кислоты превращает эти замещающие группы в винильные группы. Образующий таким образом протопорфирин IX переходит в гем, после присоединения атома железа.

О ферментах, принимающих участие в отдельных этапах биосинтеза порфиринов на сегодняшний день известно мало.

РАСПАД ЖЕЛЕЗОПОРФИРИНОВ

Первой реакцией, происходящей в ретикуло-эндотелиальной системе печени и селезенки, является окисление гема в гемоглобине. Образуется хемоглобин или вердоглобин. Атом трехвалентного железа удерживает пиррольные кольца в первоначальном положении, но одна из метиновых (α) связей удаляется кислородным путем (под видом CO). Железо легко отщепляется разведенной кислотой. После удаления железа биологическим путем, отщепляется белковый компонент, а тетрапиррольная система принимает линейную форму; получается зеленое соединение, биливердин.

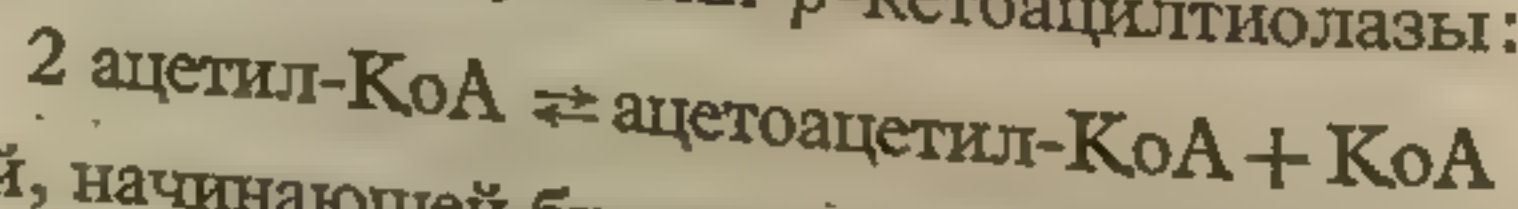
Восстановление в печени приводит к образованию красного пигмента, билирубина. Дальнейший ход реакции дает уробилиноген, являющийся наряду с билирубином физиологической составной частью желчи.

Дальнейшие превращения, состоящие в постепенном восстановлении билирубина, происходят в кишечнике. Восстановление винильных групп (присоединение 4H) дает мезобилирубин, а дальнейшее восстановление (4 атома водорода) — бесцветный мезобилирубиноген. Окисление отнимает 2 атома водорода и дает уробилин, который в свою очередь присоединяет 4 атома водорода и переходит в главный экскреторный продукт обмена порфиринов, желтый стеркобилин кала.

ОБМЕН ЖИРОВ

СИНТЕЗ ЖИРОВ

Основным вопросом биосинтеза жиров является происхождение жирных кислот. Опыты с изотопами показали, что они происходят от реактивного двууглеродного фрагмента, которым оказался ацетил-КоА. Он образуется при кислородном разложении сахаров, путем декарбоксилирования пируватной кислоты. Он частично сгорает в цикле трикарбоновых кислот, а частично используется для синтеза жирных кислот, в ходе конденсации в активный ацетоацетат, в присутствии β -кетоацилтиолазы:



Другой реакцией, начинающей биосинтез жирных кислот, является присоединение CO_2 к ацетил-КоА. Эта реакция эндозергична; она должна быть сопряжена с разложением АТФ в АДФ. Ее катализирует фермент, содержащий, вероятно, в качестве простетической группы биотин, называемый

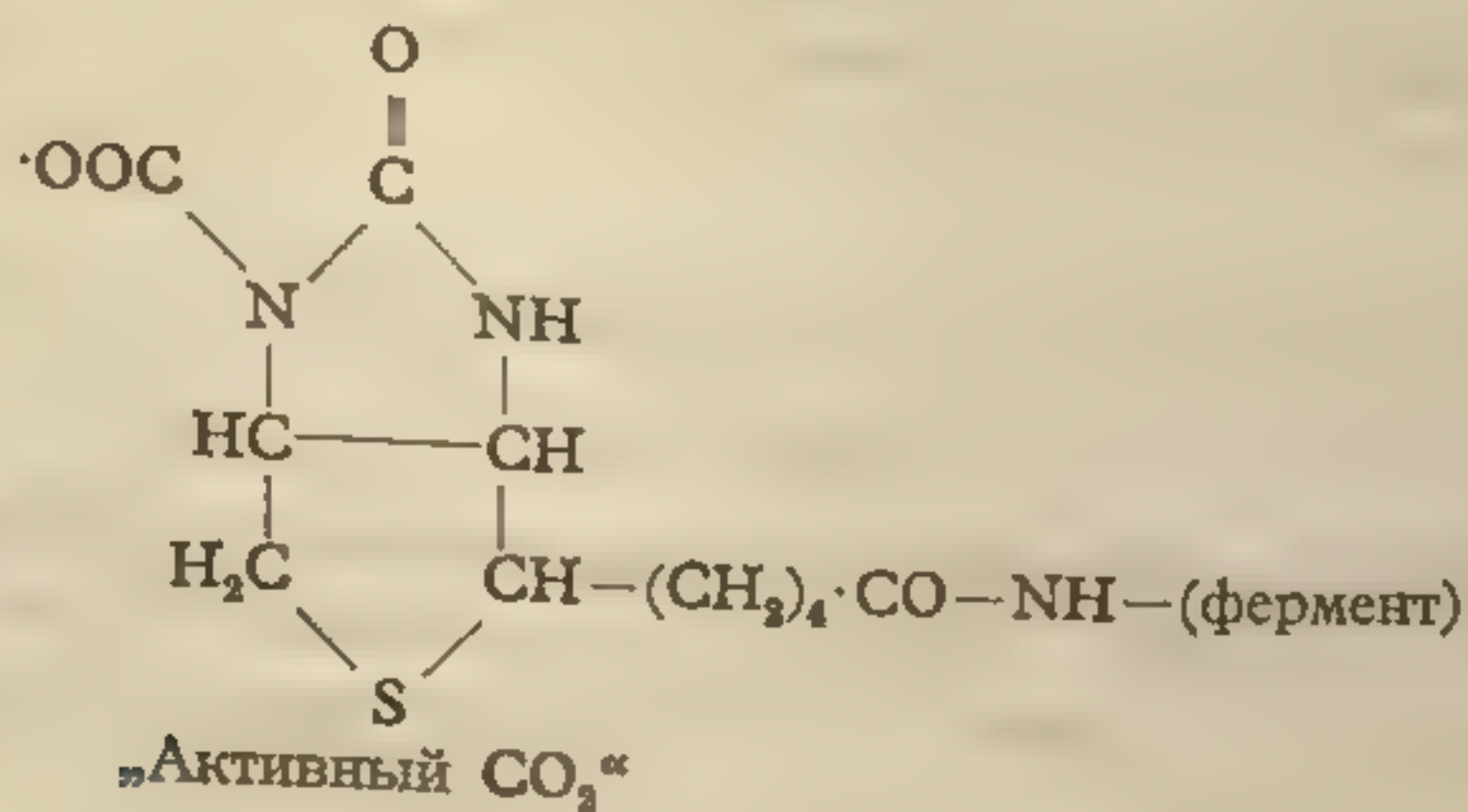
ацетил-КоА
муле

переходит
„активный“
к метиль-

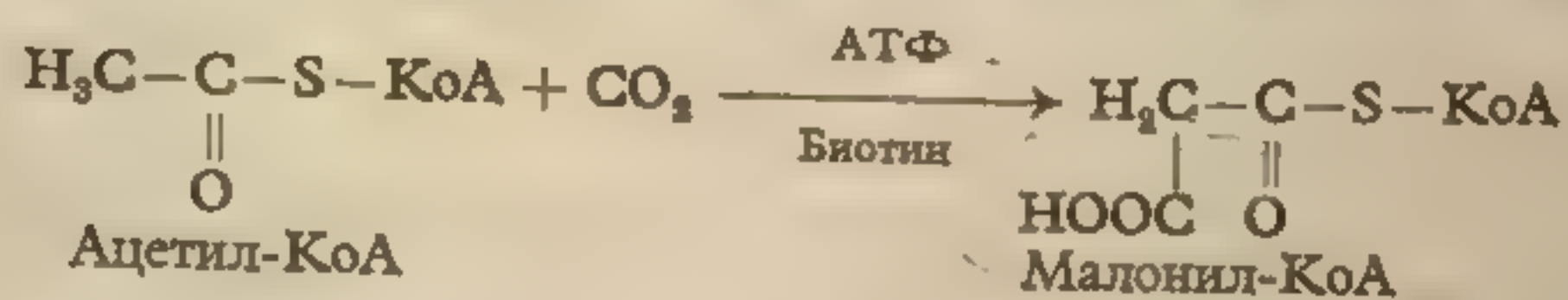
Это со-
группы -
ной длин-
образуют
-КоА и а-
Синтез
присоедин-
на 2 атома
жирных к-
(см. ниже)

Нейтрал-
рин. Глиц-
-глицероф-
(ФДГА) и
Жирные
ется бета-
углеродно-
Основной
кислот для
уксусной к-
уксусной к-
анаболичес-
Спираль
торых акти-
пать в реак-
на остаток
жирных к-
текающую

ацетил-КоА-карбоксилазой. Биотин, присоединяя CO_2 , соответственно формуле



переходит в более реактивную форму, называемую „активным CO_2 “ или „активным карбоксилем“. Реагируя с ацетил-КоА, он присоединяет CO_2 к метильной группе, в результате чего получается малонил-КоА:



Это соединение отличается особой реактивностью альфа углерода, или группы $-\text{CH}_2-$, которая легко конденсируется с ацил-КоА, в цепи различной длины. Затем промежуточное соединение декарбоксилируется, причем образуются жирные кислоты в активной форме. Таким образом из малонил-КоА и ацетил-КоА получается ацетоацетил-КоА.

Синтез высших жирных кислот проходит в основном циклически, путем присоединения двууглеродных фрагментов, а затем посредством роста цепи на 2 атома углерода после каждого цикла. Этот цикл называется спиралью жирных кислот и состоит из четырех реакций, описанных в другом месте (см. ниже).

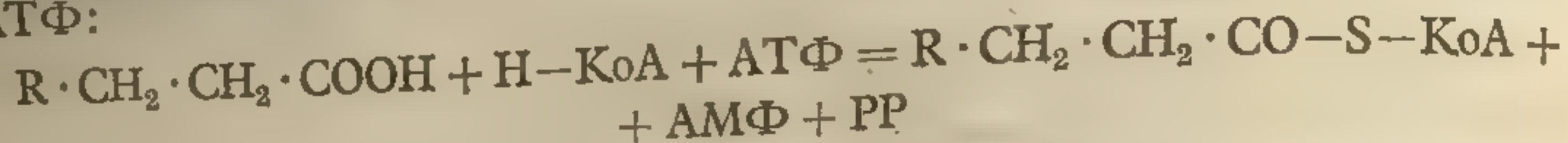
РАСПАД ЖИРОВ

Нейтральные жиры гидролизуются липазами на жирные кислоты и глицерин. Глицерин фосфорилируется АТФ в присутствии глицеролкиназы в 3-глицерофосфат, который окисляется в фосфорнокислый дигидроксиацетон (ФДГА) и становится на путь гликолитических превращений.

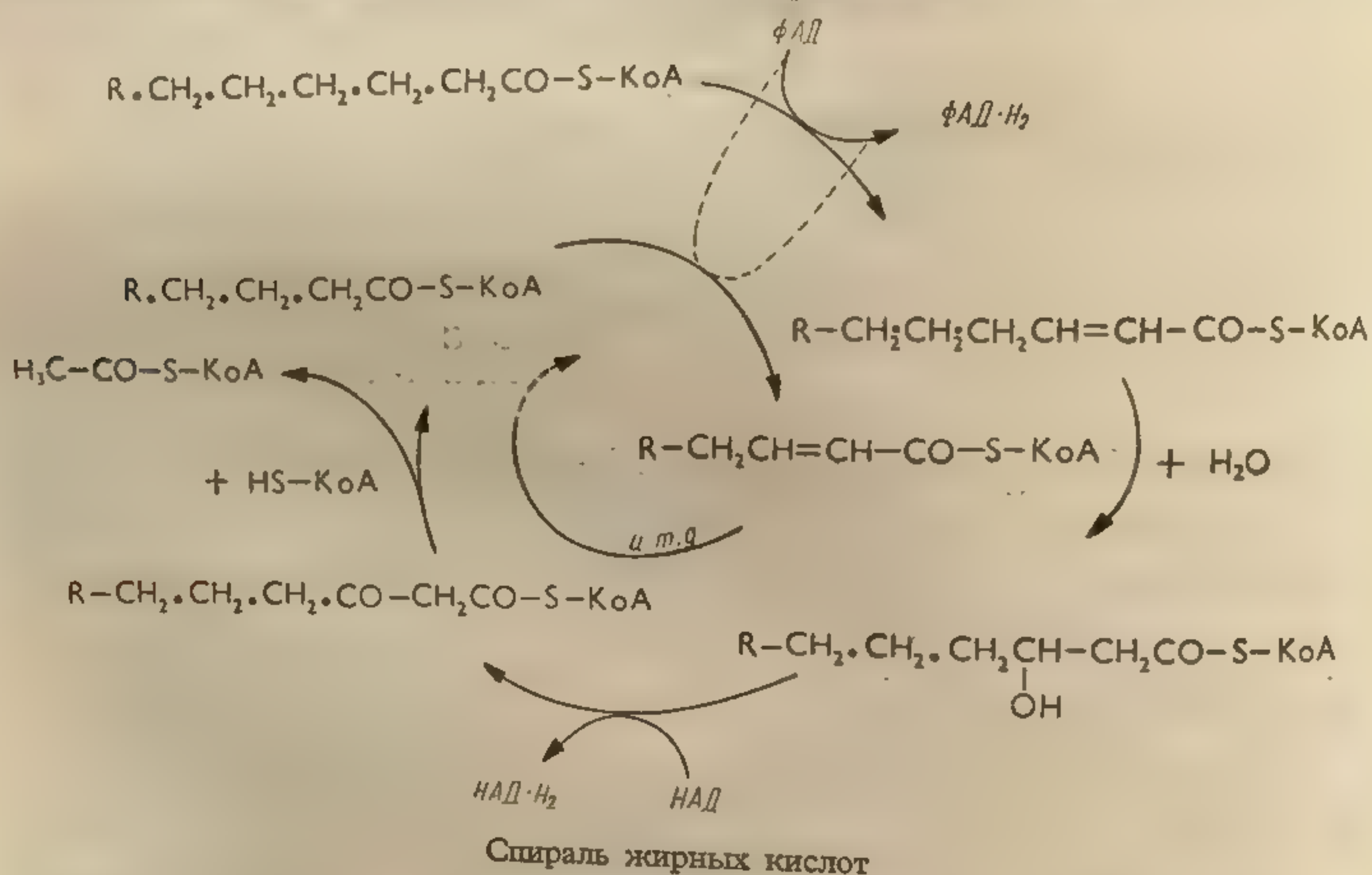
Жирные кислоты окисляются в уксусную кислоту. Этот процесс называется бета-окислением. Он превращает жирные кислоты с неразветвленной углеродной цепью в активные остатки уксусной кислоты, или ацетил-КоА. Основной механизм этого процесса тождествен с обратной спиралью жирных кислот для синтеза, с повторением цикла вплоть до уровня активной ацетоуксусной кислоты, которая частично распадается на 2 молекулы активной уксусной кислоты и частично переходит в ацетон. На этом уровне сходятся анаболический и катаболический пути обмена жирных кислот.

Спираль жирных кислот. Это цикл, состоящий из 4 реакций, в ходе которых активная форма жирной кислоты — другие формы неспособны вступать в реакцию — укорачивается или удлиняется на 2 атома углерода, то есть на остаток уксусной кислоты. Реакция удлинения цепи, то есть синтез высших жирных кислот, представляет реакцию распада, иначе укорочения цепи, протекающую в обратном направлении.

Цикл начинается с активной жирной кислоты. Активация состоит в переводе жирной кислоты в высокоэнергетическое соединение. К таким соединениям принадлежат ацил-эфиры кофермента А. Они образуются в ходе реакции жирных кислот с коферментом А за счет энергии пирофосфоролитической реакции:

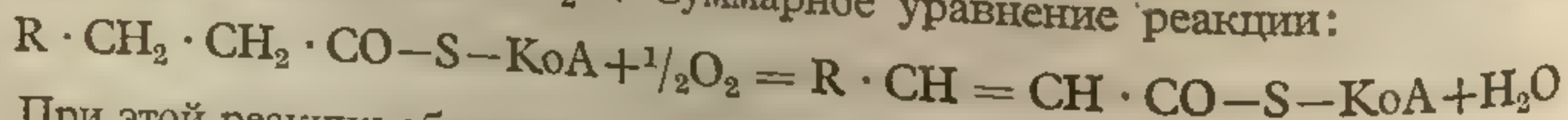


Эту реакцию катализирует лигаза, называемая ацил-KoA-синтетазой. Она обладает двойной функцией. Первоначально она создает промежуточный продукт между жирной кислотой и АТФ, с отщеплением пирофосфата, т.е.



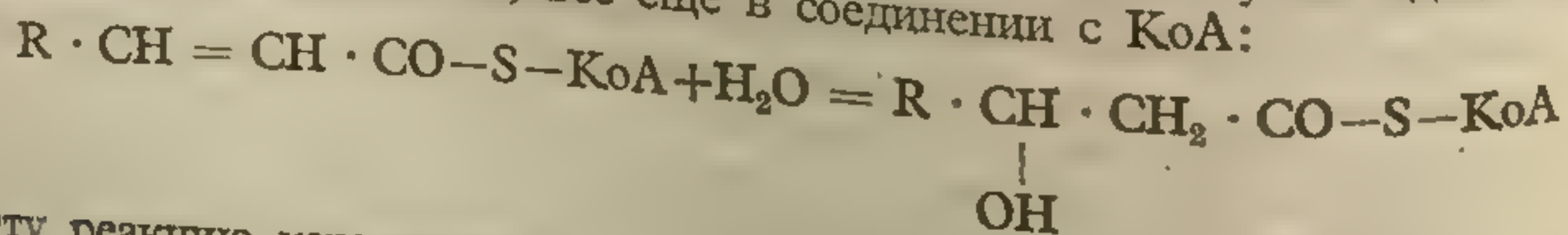
аденилат, подобный тому, который образуется при активации аминокислот. Затем KoA разлагает присоединенный к ферменту аденил на адениловую кислоту и ацил-KoA. После этого начинается собственно цикл окисления жирной кислоты.

I. Первая реакция состоит в дегидрогенации ацил-S-KoA в положении бета-углерода флавинферментом (ФАД), ацил-KoA — дегидрогеназой. Этот фермент сопряжен с цитохромом с и цитохром-оксидазой в функциональную единицу, окисляющую атомы водорода в H_2O . Суммарное уравнение реакции:



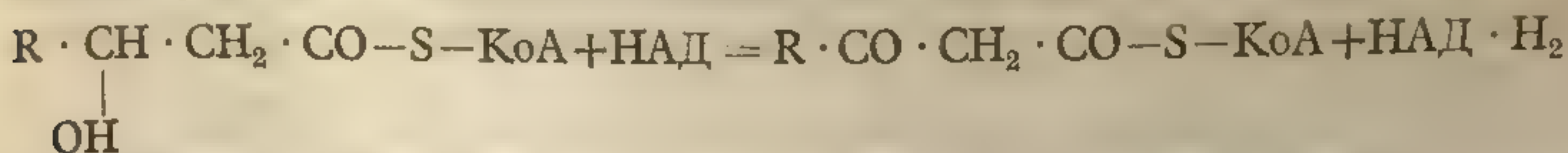
При этой реакции образуется α, β -непредельная кислота, в активной форме.

II. Очередной реакцией является присоединение молекулы воды, причем образуется β -гидрокислота, все еще в соединении с KoA:



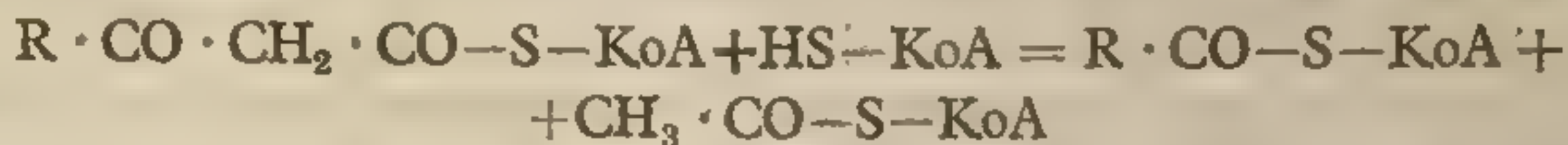
Эту реакцию катализирует еноло-KoA-гидратаза (прежнее название: кро-тоназа).

III. Третья реакция цикла представляет очередную дегидрогенацию в β -кетокислоту:



Реакцию катализирует пиридиновый фермент, 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа, передающий 2 атома водорода цепи клеточных окислений.

IV. Четвертая и последняя реакция цикла состоит в тиюкластическом расщеплении нестойкой связи $\text{C}-\text{C}$ у бета углерода. При участии новой молекулы КоА образуется жирная кислота с цепью, укороченной на 2 атома углерода (по-прежнему в активной форме), и ацетил-КоА:

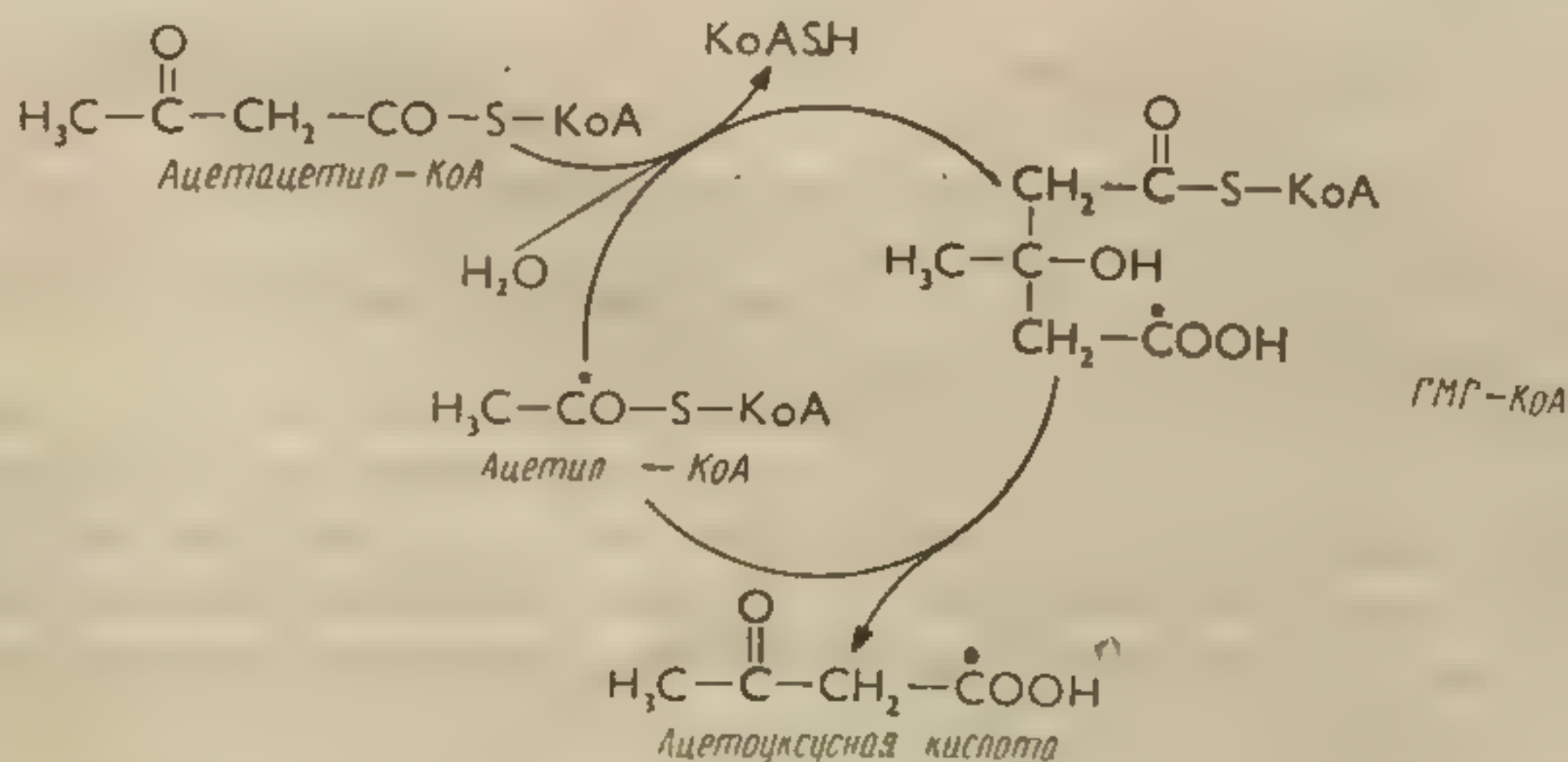


Фермент, катализирующий эту реакцию, называется 3-кетоацил-КоА-тиолазой (β -кетотиолаза). По существу, это фермент типа трансферазы, который при обратной реакции удлиняет углеродную цепь активной жирной кислоты на 2 атома углерода.

Таким образом, при одном обороте, или в одном витке спирали от жирной кислоты удаляется одна молекула ацетил-КоА. Следующий оборот цикла сокращает цепь активной жирной кислоты. Процесс идет последовательно, вплоть до ацето-ацил-КоА, который может разложиться на 2 молекулы ацетил-КоА, или пойти по пути образования кетосоединений (свободной кетокислоты и ацетона).

Ацетил-КоА является тем метаболитом на пути распада жирных кислот, который способен полностью окисляться на 2CO_2 и $2\text{H}_2\text{O}$. Это происходит в цикле лимонной кислоты, которому принадлежит этот активный двууглеродный фрагмент.

Ацетил-КоА является в то же время структурным элементом при образовании новых жирных кислот. Те же 4 реакции цикла проходят в обратном направлении по отношению к бета-окислению. Однако, β -гидроксимасляная кислота синтезируется иначе.



Цикл β -гидрокси, β -метилглутарил-КоА

Ацетоацетил-КоА конденсируется в присутствии ГМГ-синтетазы с ацетил-КоА в шестиуглеродное соединение, обозначаемое символом ГМГ (β -гидрокси- β -метилглутаровая кислота), конечно, в активной форме т.е. соединенное тиоэфирной связью с КоА. То же соединение создается в про-

цессе превращения лейцина. ГМГ-КоА подвергается ферментативному разложению (ГМГ-лиаза) в печени на свободную ацетоуксусную кислоту и ацетил-КоА. Таким образом оно становится источником ацетона и β -гидроксимасляной кислоты.

Ацетил-КоА повторно входит в цикл реакции (цикл ГМГ-КоА).

Помимо того, ГМГ является предшественником в синтезе холестерина.

СИНТЕЗ ФОСФАТИДОВ

Ферментативный синтез лецитина и кефалина начинается с активации холина и этаноламина. Реакция протекает в два этапа. При первой реакции с АТФ образуется фосфорилхолин (фосфорилэтаноламин).

$\text{Холин} + \text{АТФ} = \text{фосфорилхолин} + \text{АДФ}$ [холин-киназа].

Затем в реакции принимает участие ЦТФ, кофермент трансферазы, переносящей остаток ЦМФ:

$\text{фосфорилхолин} + \text{ЦТФ} = \text{ЦДФ-холин} + \text{РР}$ [цитидилилтрансфераза]

Активная форма холина, т.е. ЦДФ-холин, реагирует непосредственно с диглицеридами:

$\text{ЦДФ-холин} + \alpha, \beta\text{-диглицерид} = \text{лецитин} + \text{ЦМФ}$ [фосфохолинтрансфераза]

Эту реакцию катализирует второй фермент типа трансферазы.

Подобным образом из этаноламина получается кефалин. ЦТФ регенерируется из ЦМФ в реакции с АТФ, катализируемой нуклеозидмонофосфаткиназой, первоначально в форме ЦДФ:

$\text{ЦМФ} + \text{АТФ} = \text{ЦДФ} + \text{АДФ}$

а потом в форме ЦТФ, при участии очередной фосфотрансферазы (нуклеозиддифосфаткиназа):

$\text{ЦДФ} + \text{АДФ} = \text{ЦТФ} + \text{АМФ}$

Суммарная реакция образования лецитина имеет следующую форму:

$\text{холин} + \text{диглицерид} + 2\text{АТФ} = \text{лецитин} + \text{АДФ} + \text{АМФ} + \text{РР}$

РАСПАД ФОСФАТИДОВ

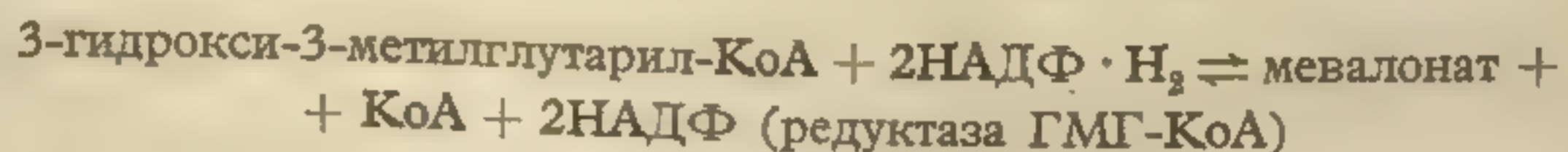
Распад на четыре составные части происходит вследствие поочередного воздействия 4 ферментов, фосфолипаз А, В, С и D.

Фосфолипазы А и В являются карбоксилгидролазами, разрывающими в фосфатиде эфирные связи между глицерином и жирными кислотами, предельной и непредельной. Фосфолипазы С и D представляют собой гидролазы фосфатных диэфиров. Первая отщепляет гидролитически фосфорилхолин, вторая — только холин от фосфатида. Во втором случае остается фосфатидная кислота.

БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА

Этот процесс был за последние годы хорошо изучен, а ряд ферментов, принимающих участие, хорошо охарактеризован. Ряд реакций, ведущих от ацетил-КоА к холестерину, представленный в таблице-приложении к стр. 126. слишком велик для обсуждения в этом руководстве.

ГМГ-КоА восстанавливается НАДФ·Н₂, в присутствии специфической редуктазы, в мевалоновую кислоту:



Эта реакция завершает первую фазу синтеза холестерина. Для этой фазы необходим КоА.

Вторая, анаэробная фаза состоит из ряда реакций переноса фосфата с АТФ на метаболиты цикла (катализируемых киназами), т.е. на мевалоновую и фосфомевалоновую кислоты, затем из декарбоксилирования, также с участием АТФ, в пятиуглеродное соединение изопентенилфосфат.

Затем следует реакция изомеризации между изопентенилфосфатом и диметилаллилипирофосфатом. Два изомерных пятиуглеродных остатка конденсируются в геранилфосфат, а потом, с третьим остатком, образуют фарнезилфосфат. Вторая очередная изомеризация преобразовывает это соединение в неродилфосфат. И снова два изомерных С₁₅-соединения конденсируются в присутствии специфической синтетазы, образуя 30-углеродный сквален. Затем сквален-циклогидроксилаза, действующая в присутствии НАД·Н₂ или НАДФ·Н₂ превращает это соединение в ланостерол. Очередные реакции осуществляют кислородным путем удаление трех метильных групп в виде СО₂, окисление и восстановление углерода в положении 3, а также удаление некоторых двойных связей и введение новой, в положении 5.

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

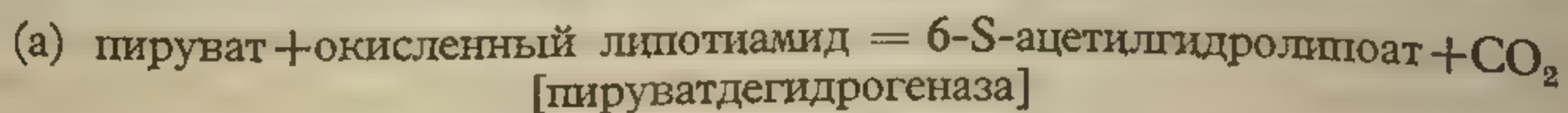
РАСПАД ПРОСТЫХ И СЛОЖНЫХ УГЛЕВОДОВ

Центральную роль в метаболизме углеводов играет глюкоза и ее высокомолекулярный полимер гликоген. Распад этих веществ является одним из главных источников энергии для организма.

Разложение углевода может проходить по двум основным метаболическим путям. Одним из них является анаэробный распад т.е. фосфорилирующий гликолиз на пировиноградную и молочную кислоты. Из одной молекулы глюкозы образуются 2 молекулы пирувата. Второй путь носит название пентозофосфатного цикла и представляет собой кислородный распад глюкозы, переходящей в пентозы, Н₂О, СО₂ и пировиноградную кислоту. Из молекулы сахара образуется 1 молекула пирувата. Оба реакционных пути описаны в другом месте (стр. 130 и 132).

На уровне пировиноградной кислоты встречаются пути кислородного и анаэробного разложения глюкозы (гликогена) и тех простых сахаров, которые превращаются в глюкозу.

Пировиноградная кислота подвергается кислородному декарбоксилированию и, после отщепления СО₂, переходит в ацетил-КоА. В этой реакции принимают участие 4 кофермента и комплекс ферментов. Из этой высокомолекулярной системы ферментов (система пируватоксидазы) можно изолировать 4 индивидуальных фермента, катализирующих отдельные реакции:



Липотиамида представляет соединение тиаминопирофосфата с липоатом. Он активизирует упомянутую реакцию значительно сильнее, чем липоат.

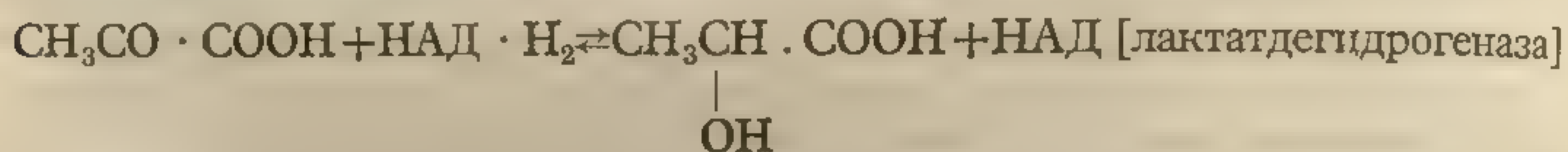
(б) 6-S-ацетилгидролипотиамид + КоА = дигидролипотиамид + ацетил-КоА [липоат-ацетилтрансфераза]

(в) дигидролипотиамид + НАД = окисленный липотиамид + НАД·Н₂
[липоамид-дегидрогеназа]

(г) НАД·Н₂ + окисленный цитохром с = НАД + восстановленный цитохром с [НАД·Н₂-редуктаза-цитохром с]

Фермент, катализирующий реакцию (а) принадлежит к флавопротеидам. Как видно, описанная последовательность реакций кислородного декарбоксилирования пировиноградной кислоты требует присутствия кислорода, необходимого для поддержания окисления цитохрома с.

Если недостает кислорода для реоксидации НАД·Н₂, а тем самым и дигидролипотиамида, пировиноградная кислота накапливается и частично восстанавливается в молочную кислоту:



Подобным образом действует тиаминовый авитаминоз.

Необходимо подчеркнуть, что кислородное декарбоксилирование α-кетоглутаровой кислоты идет аналогичным путем, но получается другой продукт реакции.

Теперь рассмотрим судьбы ацетил-КоА. Этот метаболит образуется также при кислородном распаде жирных кислот. Он сгорает полностью, переходя в 2СО₂ и 2Н₂О в т.н. цикле лимонной кислоты.

ЦИКЛ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ (ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ)

Этот цикл состоит из 9 последовательных реакций, катализируемых 7 специфическими ферментами, рядом коферментов и ионов. Характерной чертой этого цикла является способность перерабатывать огромное количество ацетил-КоА при весьма низкой концентрации метаболитов этого цикла. Присутствие последних, однако, необходимо, а прибавление этих метаболитов каталитически стимулирует очередные реакции цикла превращения ацетил-КоА.

Порядок реакций изображает схема на стр. 129.

Первая реакция состоит в конденсации ацетил-КоА с щавелевоуксусной кислотой. Ее катализирует цитрат-синтетаза (неправильно называемая конденсирующим ферментом или оксалоацетаттрансферазой). Образующаяся лимонная кислота в свою очередь подвергается превращению в цис-аконитовую кислоту. Реакция отторжения молекулы воды, катализируется аконитатгидратазой (неправильное название: аконитаза).

Цис-аконитовая кислота, присоединяя молекулу воды, переходит в изолимонную кислоту под влиянием того же фермента.

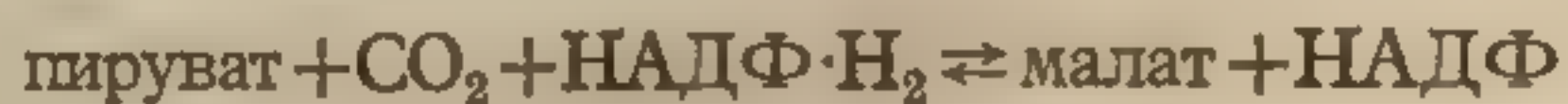
Изолимонная кислота окисляется в щавелевоянтарную кислоту. Фермент, катализирующий эту реакцию, ускоряет, собственно говоря, два процесса: дегидрогенацию при участии НАДФ и декарбоксилирование до стадии α-кетоглутаровой кислоты. При этом отщепляется первая молекула СО₂, а первая пара атомов водорода (2Н) окисляется в воду при участии цепи окислений (НАДФ·Н₂-цитохром с, редуктаза и цитохром-оксидаза), сопряженной с циклом.

Дальнейшей реакцией является кислородное декарбоксилирование α-кетоглутаровой кислоты, механизм которого тождествен с механизмом декарб-

Фумаровая кислота присоединяет под влиянием фумаратгидратазы (ранее фумаразы) молекулу воды и переходит в яблочную кислоту. Дегидрогенация малата малатдегидрогеназой с НАД в качестве акцептора атомов водорода создает оксалоацетат, который, конденсируясь с новой молекулой ацетил-КоА, делает возможным следующий оборот цикла.

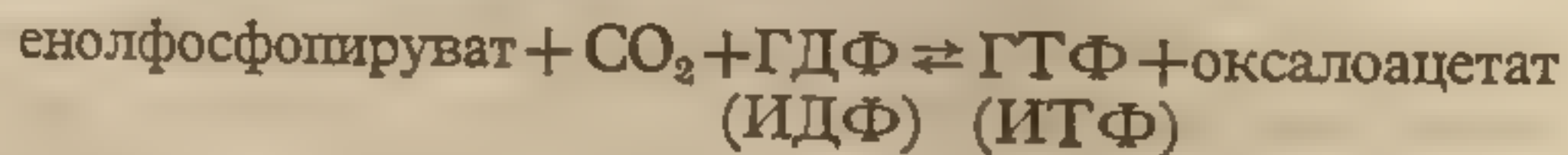
Последняя дегидрогенация цикла дает четвертую молекулу воды. Цикл трикарбоновых кислот доставляет 2 предшественника для синтеза аминокислот: α -кетоглутаровую кислоту, из которой путем трансаминирования образуется глутаминовая кислота, и щавелевоуксусную кислоту, подобным образом переходящую в аспарагиновую кислоту.

Щавелевоуксусная кислота, необходимая для вовлечения молекул ацетил-КоА в цикл, может синтезироваться путем трансаминирования из аспарагиновой кислоты, и подобным, хотя и непрямым путем, из глутаминовой кислоты. Второй реакцией, доставляющей этот важный метаболит, является присоединение CO_2 к пировиноградной кислоте с образованием малата:



который в цикле трикарбоновых кислот переходит в оксалоацетат. Фермент, катализирующий эту реакцию, называется (декарбоксилирующей) малатдегидрогеназой.

Третья реакция, производящая оксалоацетат, состоит в присоединении CO_2 к енолфосфопировиноградной кислоте:



Эту реакцию катализирует пируваткарбоксилаза, находящаяся в митохондриях.

При сгорании ацетил-КоА в цикле лимонной кислоты возникает одна молекула высокоэнергетического соединения ГТФ из ГДФ. Эта эндергическая реакция сопряжена с распадом сукцинил-КоА в янтарную кислоту.

ФОСФОРИЛИРУЮЩИЙ ГЛИКОЛИЗ

Для этого пути распада углеводов характерно то, что процесс протекает без участия кислорода, а все метаболиты этого ряда реакций являются фосфатными эфирами. Две оксидоредуктивные реакции этого ряда представляют собой, по существу, реакцию дисмутации или внутримолекулярного переноса 2 атомов водорода с альдегида на алкоголь.

Конечным продуктом фосфорилирующего гликолиза является пировиноградная кислота. Из молекулы глюкозы образуются 2 молекулы пировиноградной кислоты.

Последовательность гликолиза изображена на таблице (см. приложения).

Гликолиз начинается с гликогена или глюкозы. Гликоген разлагается фосфоролитически, т.е. при участии неорганического фосфора, в глюкозо-1-фосфатный сложный эфир. Реакцию катализирует α -1,4-глюкан-фосфорилаза. Фермент, по существу, является специфической трансглюкозилазой, переносящей концевые гликозильные остатки с полигликозильной цепи на фосфат, служащий акцептором. Реакция обратима; гликоген *in vitro* может синтезироваться из глюкозо-1-фосфатного эфира, при наличии акцепторов гликозильных остатков, в форме гликогена, смежных декстринов или коротких гликозильных цепей.

Следующей реакцией гликолитического ряда является внутримолекулярный перенос фосфатного остатка с положения 1 в положение 6. Фермент, катализирующий эту реакцию, принадлежит к фосфотрансферазам. Перенос осуществляется при участии глюкозо-1,6-дифосфата в качестве кофермента. По-видимому, кофермент не принимает участия в реакции, так как его количество не изменяется. В действительности он является реагентом в транспорте фосфата, и его реакция идет в два этапа.

Глюкозо-6-фосфат образуется также непосредственно из глюкозы путем фосфорилирования последней при участии фосфотрансферазы (глюкокиназы), переносящей крайнюю фосфатную группу с АТФ на сахар. Реакция смещена полностью вправо и сильно эндоэргична. Высокоэнергетический АТФ покрывает расход энергии и делает возможным углеводный обмен. Необходимым активатором является Mg^{++} , и реакция, вероятно, управляется гормонально.

Глюкозо-6-фосфат превращается в свой изомер, фруктозо-6-фосфат, под влиянием фосфоглюкозоизомеразы.

Следующее звено цепи представляет собой реакцию, которая нуждается в сопряжении с распадом АТФ. Катализирующим ферментом является фосфотрансфераза (фосфотриозкиназа), которая переносит фосфатную группу с АТФ на положение 1 сахара.

Фруктозо-1,6-фосфат распадается под влиянием альдолазы на две фосфотриозы, т.е. фосфоглицеральдегид (ФГА) и фосфодигидроксиацетон (ФДГА). Обе фосфотриозы находятся в положении равновесия, смещенного в сторону ФДГА и катализируемого фосфотриозоизомеразой. Кроме того, происходит дисмутационный обмен пары атомов водорода при участии двух ферментов типа дегидрогеназ и общего кофермента НАД. Фермент, содержащий в простетической группе глутатион, передает с ФГА 2 атома водорода на ФДГА. ФГА, присоединяя неорганический фосфор, переходит в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту, а ФДГА восстанавливается в 3-глицерофосфат. Эта реакция экзоэргична и приводит к образованию высокоэнергетического карбоксилфосфата, т.е. 1,3-дифосфоглицериновой кислоты.

Ферменты, принимающие участие в реакции дисмутации, называются дегидрогеназой ФГА и 3-глицерофосфат-дегидрогеназой. У обоих ферментов активной группой является НАД.

1,3-фосфоглицериновая кислота передает свой высокоэнергетический фосфат с положения 1 на акцептор фосфатной группы, АДФ. Во время реакции, катализируемой фосфоглицераткиназой, образуются АТФ и 3-фосфоглицериновая кислота.

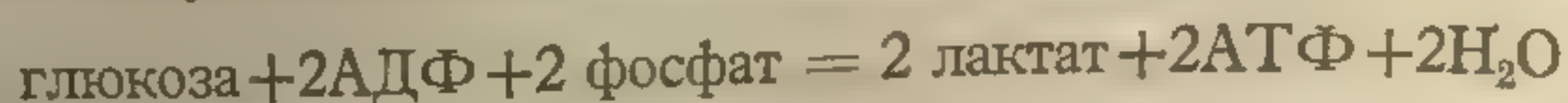
3-фосфоглицериновая кислота, под влиянием фосфоглицеромутазы и в присутствии кофермента, 2,3-дифосфоглицерата, переходит в 2-фосфоглицериновую кислоту. Реакция протекает аналогично той, которую катализирует фосфоглюкомутаза.

Фосфопируватгидратаза (ранее енолаза), в свою очередь, катализирует присоединение молекулы воды к 2-фосфоглицерату; образуется енолфосфопируват, который, в отличие от своего предшественника, является высокоэнергетическим соединением.

Энергия, накопленная в енолфосфопирувате, переносится с остатком фосфорной кислоты на АДФ, в результате чего последний переходит в АТФ. Реакцию катализирует пируваткиназа. Вторым продуктом реакции, полностью смещенной в сторону продуктов, является пировиноградная кислота. Реакция идет только в присутствии ионов K^{+} .

Пировиноградная кислота подвергается, в анаэробных условиях, восстановлению посредством НАДФ· H_2 в молочную кислоту. Эта реакция катализируется лактатдегидрогеназой. Это конечная реакция гликолитического ряда.

Сумма промежуточных реакций на пути от глюкозы до молочной кислоты выражается следующим стехиометрическим уравнением:



Падение свободной энергии на моль глюкозы равняется $-27,7$ ккал. при рН 7 и при прочих условиях приближенных к биологическим. Значительная часть этой энергии, а именно $2 \times 8,14 = 16,28$ ккал., т.е. около 60%, накапливается в 2 молях АТФ.

Опыты с изотопами показали, что все реакции гликолитического ряда обратимы. Можно ожидать, что в соответствующих условиях из каждого метаболита этого ряда, не исключая пирувата и лактата, может получиться гликоген. Глюкоза образуется в печени путем дефосфорилирования глюкозо-6-фосфата специфической глюкозо-6-фосфат-фосфатазой.

ЦИКЛ ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА (Пентозо-фосфатный цикл)

Помимо окисления глюкозы с предшествующим фосфорилирующим гликолизом, превращение виноградного сахара может пойти также по линии прямого окисления глюкозо-6-фосфата. На этом пути образуются пентозы, поэтому его называют также пентозо-фосфатным циклом. Рибозо-5-фосфат служит катализатором этого цикла и, подобно щавелевоуксусной кислоте, каталитически влияет на цикл лимонной кислоты. Продуктами цикла являются молекула триозофосфатного эфира и 3 молекулы CO_2 . Молекулы CO_2 происходят от углеродов 1—3 глюкозы, углерод 4 превращается в альдегидную группу ФГА. Триозофосфат преобразовывается в конечной фазе цикла в пируват.

Последовательность реакций цикла и их стехиометрия представлены в общей схеме:

Пентозо-фосфатный цикл

- а) глюкозо-6-фосфат \rightarrow 6-фосфоглюконовая кислота
- б) 6-фосфоглюконовая кислота \rightarrow рибулозо-5-фосфат + CO_2 (C_1 глюкозы)
- в) рибулозо-5-фосфат \rightarrow ксилулозо-5-фосфат
- г) ксилулозо-5-фосфат + рибозо-5-фосфат \rightarrow седогептулозо-7-фосфат + глицеральдегид-3-фосфат
- д) седогептулозо-7-фосфат + глицеральдегид-3-фосфат \rightarrow фруктозо-6-фосфат + эритрозо-4-фосфат
- е) фруктозо-6-фосфат \rightarrow глюкозо-6-фосфат

Затем повторяются реакции а, б и в со следующим результатом:

- глюкозо-6-фосфат \rightarrow ксилулозо-5-фосфат + CO_2 (C_2 глюкозы)
- ж) ксилулозо-5-фосфат + эритрозо-4-фосфат \rightarrow фруктозо-6-фосфат + глицеральдегид-3-фосфат

Повторяются реакции е, а, б с результатом:

- фруктозо-6-фосфат \rightarrow рибулозо-5-фосфат + CO_2 (C_3 глюкозы)
- з) рибулозо-5-фосфат \rightarrow рибозо-5-фосфат

Сумма реакций: глюкозо-6-фосфат + (рибулозо-5-фосфат) \rightarrow глицеральдегид-3-фосфат + (рибулозо-5-фосфат).

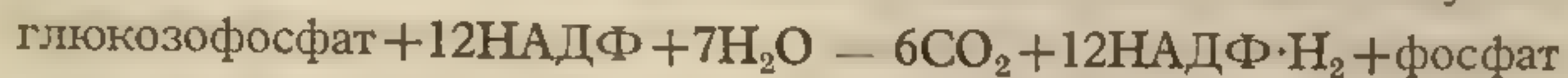
Как видно из приведенного, необходимая для начала реакции молекула рибозо-5-фосфата, используемая в реакции (г), синтезируется заново в дальнейшем.

нейших звеньях цикла (реакция 3), и поэтому не упоминается в суммарном уравнении реакции. Для успешного хода реакций цикла достаточно малого количества этого сложного эфира. Поэтому ему приписывают „каталитическую“ функцию.

Отдельные реакции катализируются следующими ферментами:

- а) окисление глюкозо-6-фосфата катализируется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой с НАДФ в качестве кофермента;
- б) декарбоксилирование проходит в двух этапах и требует двух дегидрогеназ 6-фосфоглюконата, одна из них должна быть декарбоксилирующей. Коферментом является НАДФ;
- в) рибулозо-фосфат-эпимераза;
- г) реакция переноса кетозильного остатка между двумя фосфопентозами катализируется транскетолазой;
- д) реакция переноса альдозной группы катализируется трансальдолазой;
- е) глюкозо-6-фосфат-изомераза;
- ж) транскетолаза;
- з) рибозофосфатизомераза.

Если провести стехиометрический расчет разложения глюкозо-6-фосфата вплоть до конечных продуктов, то после полного окисления получается:



Пентозо-фосфатный цикл доставляет рибозо-5-фосфат, необходимый для синтеза нуклеотидов и для подмены этого эфира в динамически обновляющихся соединениях (например нуклеиновые соединения).

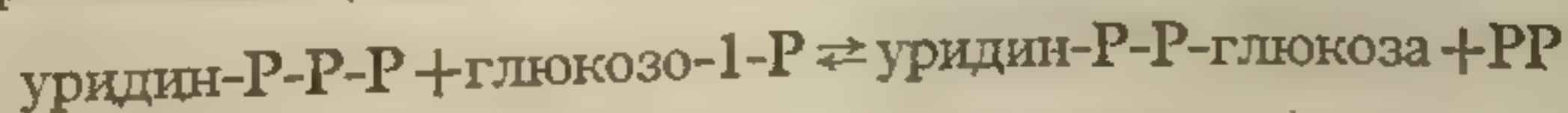
БИОСИНТЕЗ ПРОСТЫХ И СЛОЖНЫХ УГЛЕВОДОВ

Большинство простых сахаров типа гексозы (глюкоза, фруктоза, манноза и галактоза) поступает в организм в виде алиментарных углеводов, соответствующим образом разлагаемых в кишечнике. Кроме того, путем гликонеогенеза из несахарных предшественников образуется эндогенная глюкоза. Такими предшественниками являются жирные кислоты, некоторые аминокислоты, а также ряд продуктов гликолитического и кислородного распада сахаров (молочная, пировиноградная, дикарбоновые и трикарбоновые кислоты, глицерин и т.п.). В ресинтезе молекулы глюкозы участвует также CO_2 .

Опыты с изотопами показали, что глюкоза образуется путем ресинтеза из продуктов распада глюкозы, через фосфорилированные метаболиты, один из которых, глюкозо-6-фосфат разлагается в печени под влиянием специфической фосфатазы на фосфат и свободную глюкозу.

Сложные сахара образуются подобным же образом. Основной механизм биосинтеза состоит в переносе „активных“ глюкозильных остатков с доноров на соответствующие акцепторы. Для этого необходимы два рода ферментов, оба из группы трансфераз. Одни из них активируют глюкозильные остатки, присоединяя УДФ, другие переносят активную глюкозильную группу на другой сахар, аминсахар и другие акцепторы.

Реакция активации сахаров заключается в переносе уридиндифосфатного остатка с УТФ на фосфорилированный глюкозильный акцептор. Примером этого универсального для сахаров механизма является реакция синтеза уридиндифосфоглюкозы (УДФ-глюкоза или УДФГ):



катализируемая глюкозофосфатуридилтрансферазой. Этот фермент можно также назвать УДФГ-пирофосфорилазой. Пирофосфатная связь в УДФГ

придает соединению высокоэнергетический, а тем самым и реактивный характер. Свободная энергия гидролиза УДФГ составляет при pH 7,4 около 7600 кал/мол. Участие УДФГ в биосинтезе сахаров иллюстрирует схема на стр. 32.

Синтез гликогена в печени млекопитающих происходит с участием УДФГ, глюкозильные остатки которой под влиянием специфической трансферазы присоединяются к глюкозильной цепи. АТФ фосфорилирует освобождающийся УДФ в УТФ, который в свою очередь может активировать очередные молекулы глюкозо-1-фосфата для этого синтеза. УДФГ служит донором глюкозильного остатка в процессе синтеза сахарозы. Акцептором является фруктоза. УДФ-галактоза реагирует с глюкозо-1-фосфатом, образуя лактозо-1-фосфат.

Переброс галактозильного остатка посредством УДФ составляет один из этапов синтеза галактолипидов.

Ряд полимерных углеводов и их производных образуется из УДФ-сахаров, а именно: гиалуроновая кислота из УДФ-ацетилглюкозамина и из УДФ-глюкуроната. Целлюлоза синтезируется из УДФГ. Многие глюкозиды синтезируются в ходе ферментативных реакций переноса глюкозильного остатка с УДФ-сахара на соответствующий аглюкон.

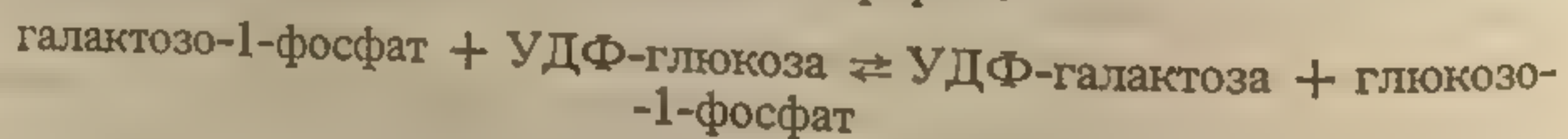
УДФ играет важную роль также при реакциях синтеза фосфатидов. Он переносит фосфохолиновый или фосфоэтаноламинный остатки.

Глюкурониды образуются в ходе ферментативной реакции с УДФ-глюкуронатом.

Сульфатные эфиры аминсахаров нуждаются, для осуществления синтеза, в добавочном введении активного сульфатного остатка, переносимого соответствующим ферментом (см. стр. 33).

Синтез гликогенов требует, кроме удлинения глюкозильных цепей в полисахариде, разветвления этих цепей. Это осуществляется путем образования 1,6-глюкозидной связи, в отличие от 1,4-глюкозидной связи в неразветвленных цепях. Существуют „разветвляющие“ ферменты — это трансферазы глюкозильных остатков. Фермент разрывает связь одного рода и переносит сахарную группу на требуемую связь (разветвляющая α -1,4-глюкан-трансфераза).

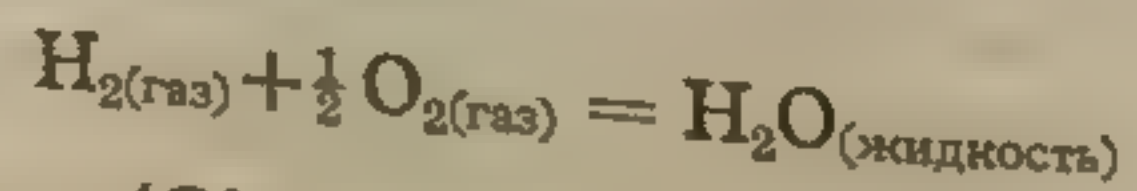
Уридинтрансферазы выполняют еще одну важную функцию. Они катализируют взаимное превращение простых сахаров, некатализируемое изомеразой. К таким реакциям принадлежит превращение глюкозы в галактозу, происходящее на уровне их фосфатных эфиров:



БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОКИСЛЕНИЯ

ЦЕПЬ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ

Биологические окисления состоят в соединении водорода с кислородом. Эта реакция проходит со значительным падением свободной энергии, которая используется для поддержания жизненных процессов. Теоретическое изменение свободной энергии для реакции:



в стандартных условиях, ΔG^0 , равняется 56,690 кал/моль водорода.

Между окислительно-восстановительным потенциалом каждой оксидоредукционной системы и полезной работой, которую эта система способна выполнить, существует следующая зависимость:

$$\Delta G^0 = -nFE_0$$

E_0 означает изменение оксидоредукционного потенциала в стандартных условиях, n количество перенесенных электронов, F число Фарадея.

Биологическое окисление водорода состоит в переносе электронов, не прямо с водорода на кислород, а через ряд биологических оксидоредукционных систем. Таким образом энергия освобождается малыми порциями и может быть использована благодаря сопряжению этих систем с реакциями, накапливающими энергию химическим путем.

Таблица 7

Оксидоредукционные потенциалы E'_0 (при pH 7) биологических систем

ΔG^0 ккал/моль	Коферменты E'_0 вольт	Система	Субстраты E'_0 вольт	Система
-12,0	-0,32	НАД·Н ₂ /НАД	-0,42	Н ₂ /2Н
	-0,185	Рибофлавин-Р-Н ₂ /рибофлавин-Р	-0,34	цистеин/цистин
			-0,22	2HSH/GS-SG (глутатион)
	-0,06	Флавиновые ферменты восст./окисл. (в митохондриях)	-0,18	лактат/пируват
-14,8	-0,05	Филлогидрохинон/филлохинон		
	-0,04	Цитохром b восст./окисл.		
	0,00	Цитохром с-редуктаза (ФАД) восст./окисл.	0,00	сукцинат/фумарат
			+0,15	лейкосоединение/метиле- новая синька
-25,3	+0,26	Цитохром с восст./окисл.	+0,20	аскорбат/дегидроаскорбат
	+0,29	Цитохром а восст./окисл.		
			+0,81	$\frac{1}{2}$ O ₂ /O ⁻

Электроны переносятся биологическими оксидоредукционными системами в очередности, определенной мнимыми оксидоредукционными потенциалами E'_0 (при pH 7), от систем с более отрицательным потенциалом. Потенциал водородного электрода при pH 7 равняется -0,42 V, а кислородного электрода 0,81 V, иначе говоря, во время перехода 2 электронов с водорода на кислород освобождается $2 \cdot 23,06 \cdot 1,23$ ккал. = -56,7 ккал/моль водорода.

Однако, в клетках окисляется не молекулярный водород, а водород, связанный с пиридиновыми коферментами, которые заимствуют его прямо от субстратов биологических окислений (глюкоза, жирные кислоты, аминокислоты и т.п.). Потенциал системы, состоящей из окисленного и восстановленного дифосфопиридиннуклеотида (НАД/НАД·Н₂) равняется при pH7 -0,32 V. Разность потенциалов этой системы и системы $\frac{1}{2}$ O₂/O⁻ равна 1,13 V. Этому изменению потенциала соответствует изменение свободной энергии (в стандартных условиях), $\Delta G^0 = -52$ ккал. Такое количество

энергии можно было бы получить при окислении 1 моля водорода, находящегося в субстрате биологических окислений, при условии полной эффективности химической машины клеток.

Совокупность биологических оксидоредукционных систем, их оксидоредукционные потенциалы и величины изменений свободной энергии иллюстрирует таблица 7.

Перенос водорода (электронов) на кислород происходит посредством следующих ферментных систем: системы пиридиновых ферментов, системы флавиновых ферментов и цитохромной системы, т.е. системы Warburg-Keilin. В последнее время постулируют еще участие витамина К (филлохинона), а также убикинона между флавопротеидной и цитохромной системами. Общую схему систем в топографической форме иллюстрирует рис. 28. Предполагают, что в митохондриальной мембране слои ферментного белка переплетаются слоями липопротеидов, содержащих коферменты (цитохромы и хиноны).

Такая система обладает способностью кислородного фосфорилирования, т.е. превращения АДФ в АТФ посредством связывания неорганического фосфата за счет свободной энергии переноса электронов на кислород. На один атом восстановленного кислорода образуется не более 3 молекул АТФ.

Рассмотрим поочередно ферментный аппарат и механизм действия этих трех основных многоферментных систем.

ПИРИДИНОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И ИХ РОЛЬ

Пиридиновые ферменты специфически активируют пары атомов водорода окисляемых метаболитов и переносят их с помощью своих коферментов, т.е. НАД или НАДФ на коферменты флавиновых ферментов. Значительная часть водорода мобилизуется пиридиновыми дегидрогеназами, участвующими в цикле трикарбоновых кислот. В этом цикле, окисляющем общие метаболиты обмена углеводов, жиров и белков, при каждом обороте цикла посредством этих дегидрогеназ переносятся 4 пары атомов. Помимо того, известны свыше 50 животных дегидрогеназ, использующих один и тот же кофермент (НАД или НАДФ), нередко попарно катализирующих реакции дисмутации пар атомов водорода. НАД·Н₂ и НАДФ·Н₂ являются донорами водорода в реакциях гидрогенизации, катализируемых специфическими редуктазами, например глутатион-редуктазой.

ФЛАВИНОВЫЕ ФЕРМЕНТЫ И ИХ РОЛЬ

Главным акцептором атомов водорода является система флавиновых ферментов, посредством которой электроны переносятся на систему Warburg-Keilin. Восстановленные пиридиновые коферменты при этом окисляются и повторно включаются в сбор активного водорода с метаболитов. Флавиновые ферменты играют двоякую роль. Во-первых они перехватывают своей простетической группой пары атомов водорода. Во-вторых, отрывают от них пары электронов и переносят их по одному на цитохром c₁. Вторая функция возможна благодаря тому, что флавопротеидная система в природном состоянии содержит многочисленные атомы железа и меди, которые в пределах каталитического центра фермента могут перенимать отдельные электроны. Речь идет о молекуле, переносящей электроны (Green), в которой находятся комплексные ферменты с молекулярной массой, порядка многих миллионов.

СИСТЕМА, ПЕРЕНОСЯЩАЯ ЭЛЕКТРОНЫ (WARBURG — KEILIN)

На материале исследований Green и Martius была составлена следующая схема переноса электронов (протонов) на кислород:

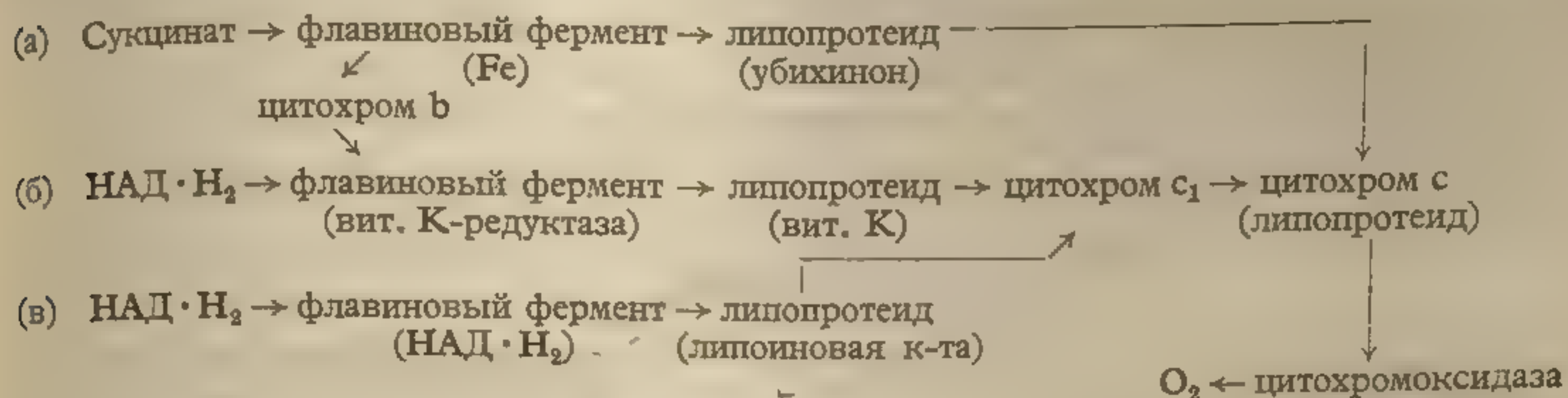


Схема учитывает наличие слоев, перемежающихся, как в бутерброде, со слоями растворимых ферментных белков. Напрашивается аналогия с комплексной системой ферментов, называемой системой сукцинат-оксидазы (а).

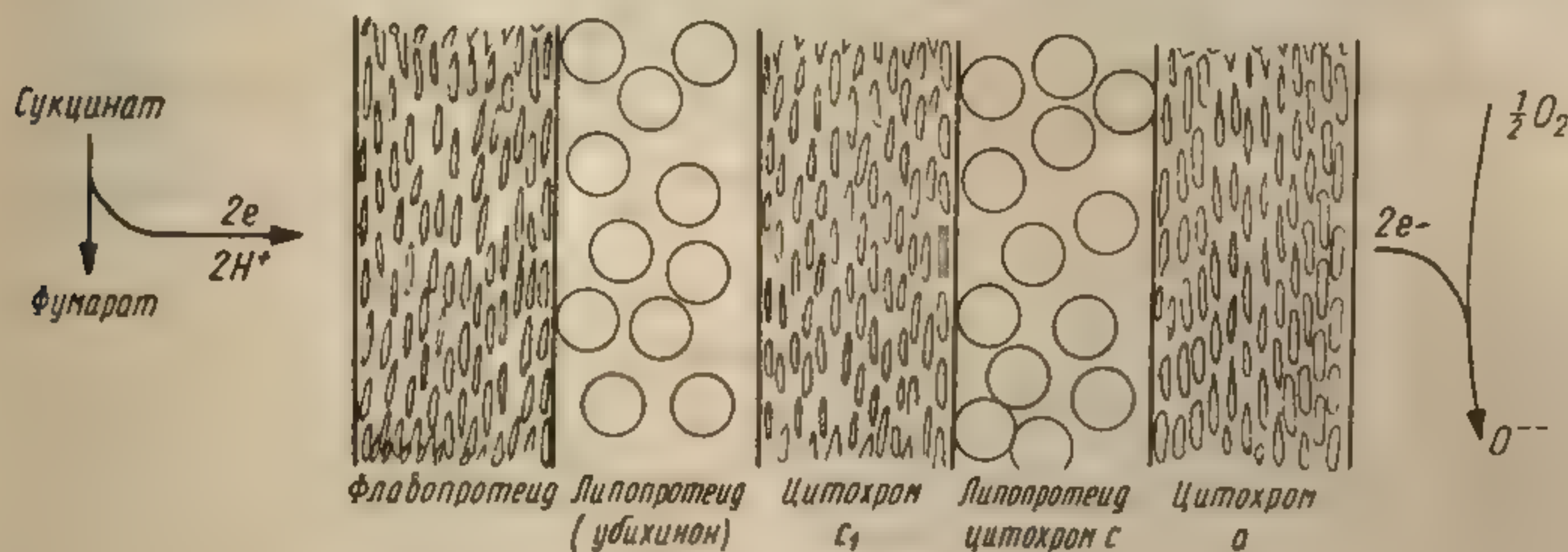
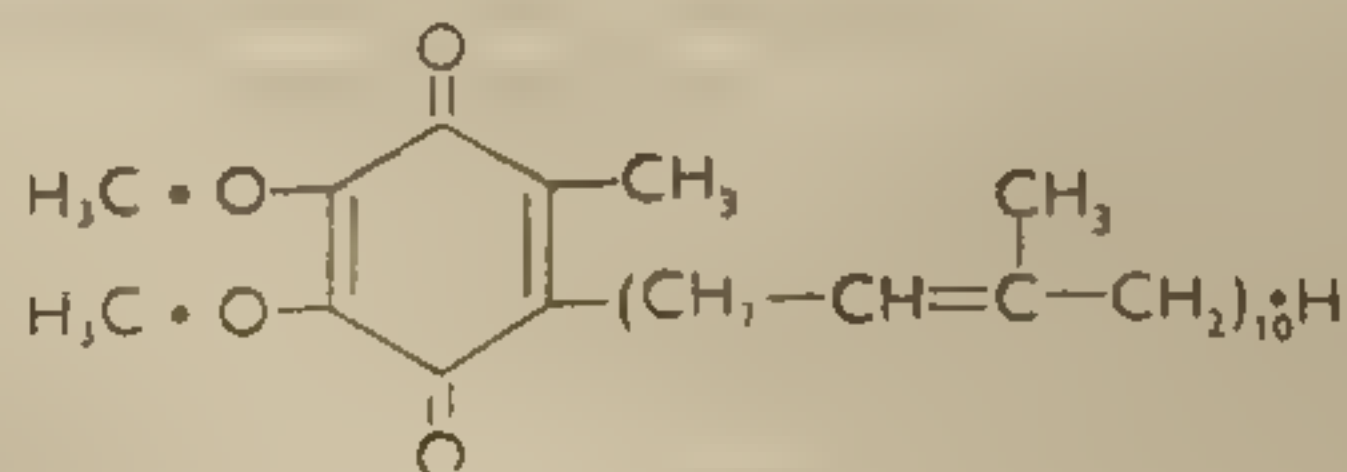


Рис. 28. Ферментная топография в цепи окислений.

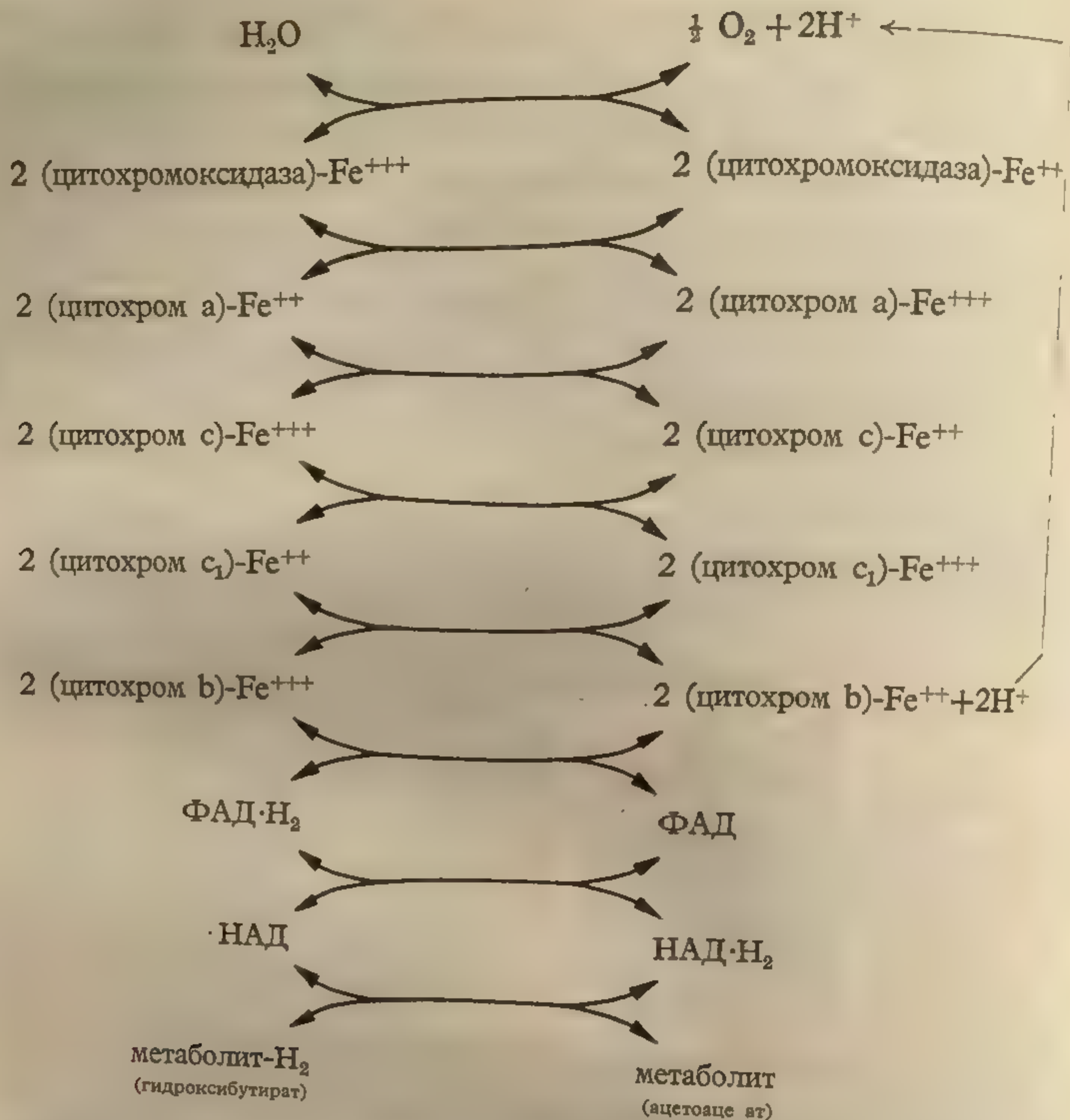
Эта система изображает путь электронов с сукцината на цитохромную систему без посредничества пиридиновых ферментов, следовательно без переноса при помощи пиридиновых коферментов. Предполагают, что в этом процессе может также участвовать убихинон или кофермент Q в роли переносчика электронов на цитохром с. Этот оспариваемый до сих пор кофермент имеет следующую структуру:



Убихинон

Был найден фермент, убихинол-оксидаза, окисляющий восстановленный убихинон (или убихинол) убихинон-редуктаза, переносящая водород с НАД \cdot H₂.

Главный путь транспорта электронов (в) следует от НАД \cdot H₂ через флавопротеидную систему на цитохром с₁, структурно весьма приближенный



к цитохрому с, следующему члену системы Warburg — Keilin. Флавиновый фермент, активной группой которого является ФАД, называется цитохром с-редуктазой (НАД·Н₂: цитохром с-оксидоредуктаза). Восстановление цитохромов с₁ и с выражается появлением характерных спектральных полос обоих коферментов.

Каталитическое влияние витамина К на окисление НАД·Н₂ цитохромной системой, подавляемое аналогами этого витамина (дикумарол), позволяет альфа-филлохинону принять на себя роль переносчика электронов. Он связан с липопротеидом. Он восстанавливается НАД·Н₂ под влиянием флавинового фермента и заново окисляется цитохромом с. Предполагают, что он необходим для кислородного фосфорилирования, а ввиду того, что перенос электронов отделим от фосфорилирования при помощи разобщающих факторов (2,5-динитрофенол, тироксин), существование отдельного метаболического пути вполне вероятно (6). Существует связь этого пути с путем передвижения электронов с сукцината, через цитохром b, не входящий в состав главной цепи сгораний. Доказательством этому служит возможность заблокировать этот путь антимицином или авитаминами К.

В природном состоянии существует функциональная единица, называемая системой оксидазы НАД·Н₂, переносящая электроны на кислород. Она

представляет собой многоферментную систему. Эта система, с морфологической точки зрения, является молекулой, переносящей электроны. Это замкнутая система в том смысле, что в нее входят электроны только с НАД·Н₂, а выходят только через молекулярный кислород. Ультразвуки или детергенты разбивают эту систему и открывают альтернативные пути через менее сложные или частично дефектные системы, описываемые под разными названиями. Частица, переносящая электроны, содержит 2 флавиновых фермента (НАД·Н₂-цитохром с-редуктаза, сукцинатдегидрогеназа), 4 рода цитохромов (с₁, с, b и a), и сверх того ряд липопротеидов, в том числе один, содержащий кофермент Q в значительной концентрации, а также негемовое железо и медь. Конечно, имеется также НАД, АТФ и ион магния.

Цитохромоксидаза, иначе цитохром a₃, обладает способностью прямо реагировать с кислородом. Это комплексный фермент, содержащий медь.

Цепь переноса электронов можно представить, в общей форме, следующим образом см. стр. 138.

Ряд флавиновых ферментов обладает способностью реагировать с молекулярным кислородом, т.е. самоокисляться. В данном случае цитохромная система становится излишней, а ферменты служат посредниками между НАД·Н₂ и НАДФ·Н₂ с одной стороны и О₂ с другой стороны. При этой реакции образуется Н₂О₂, разлагаемая каталазой. Эти ферменты называются оксидазами. Примером является оксидаза D- или L-аминокислот, глюкозо-оксидаза, ксантин-оксидаза.

КИСЛОРОДНЫЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Во время транспорта электронов освобождается значительное количество энергии. Падение свободной энергии данной системы во время перехода одной пары электронов с НАД·Н₂ на кислород равно -52,1 ккал. на моль Н₂ (таблица 7). Эта энергия сохраняется в форме высокоэнергетического соединения АТФ. Ее передача происходит благодаря сопряжению транспорта электронов с фосфорилированием АДФ в АТФ.

При сохранении целостности цепи переноса электронов, расходу кислорода соответствует убыль неорганического фосфора в пропорции О:Р = 1:3. Это явление называется кислородным фосфорилированием.

Опыты с кислородным фосфорилированием производились на осторожно изолированных митохондриях с добавлением необходимых коферментов. Были определены места в цепи сгорания, в которых происходит кислородное фосфорилирование; его необходимо отличать от фосфорилирования на уровне субстрата.

В присутствии цианида, тормозящего цитохромоксидазу, свеженезолированные митохондрии катализируют восстановление цитохрома с (за счет β-гидроксиприбутирата, фигурирующего в качестве донора электронов), но пропорция Р:О не превышает 2. Одно из кислородных фосфорилирований происходит несомненно между цитохромом с и цитохром-оксидазой, так как не было обнаружено никакого фосфорилирования во время переноса электронов с субстратов на пиридиновые коферменты.

Если субстраты окисляются цитохромом с, то антимицин А полностью блокирует кислородное фосфорилирование. Этот ингибитор действует на отрезке цепи сгорания, находящемся между цитохромами b и c. Если акцептором электронов субстрата является феррицианид, то пропорция Р:О равняется 1. Иначе говоря, одна из реакций кислородного фосфорилирования расположена в начальном отделе цепи сгорания.

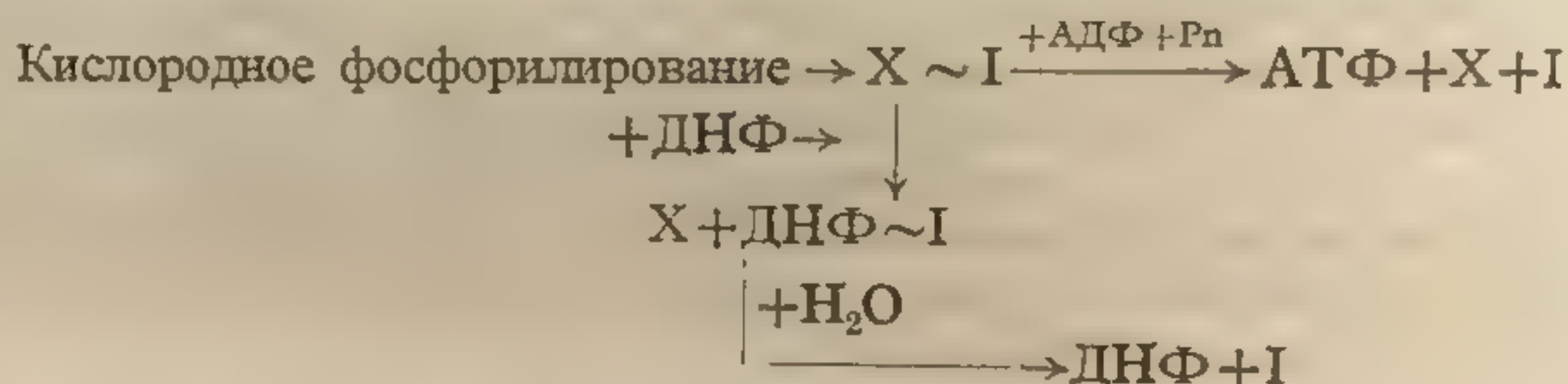
В настоящее время считают, что первое кислородное фосфорилирование

происходит во время переноса электронов с пиридиновых на флавиновые коферменты.

Следующее по порядку кислородное фосфорилирование имеет место во время окисления сукцината системой сукцинатоксидазы, точнее во время переноса электронов с цитохрома *b* на цитохром *c*. Третье, как уже упоминалось, связано с переносом электронов с цитохром-оксидазы на кислород.

Кислородное фосфорилирование тормозится дикумаролом (10^{-6} М) без одновременного влияния на дыхание. Этот факт дает основание предполагать, что посредником кислородного фосфорилирования является витамин К.

Вторым фактором, разобщающим транспорт электронов и перенос их энергии на АДФ, является динитрофенол (ДНФ). Это соединение сильно стимулирует дыхание, но полностью подавляет кислородное фосфорилирование. Предполагают, что существует весьма нестойкое промежуточное соединение ($X \sim I$) на пути кислородного фосфорилирования, с которым ДНФ реагирует следующим образом:



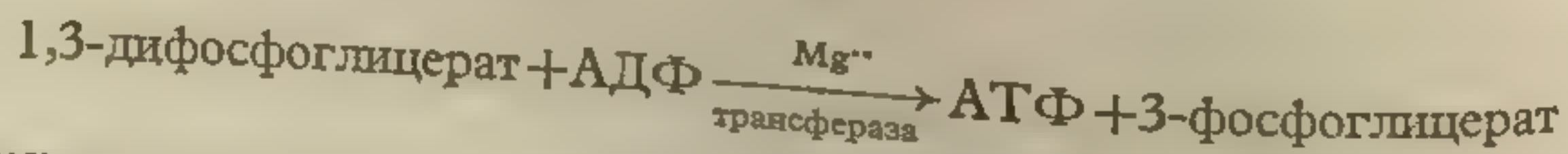
Химический механизм, сохраняющий энергию переноса электронов и передающий ее АДФ, до сих пор невыяснен. Было установлено, что реакция, сопрягающая дыхание и фосфорилирование, катализируется растворимым белком, по всей вероятности ферментом. Необходимым коферментом этой реакции служит ион Mg^{++} .

ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ НА УРОВНЕ СУБСТРАТА

Кислородное фосфорилирование является главным источником энергии жизненных процессов. Остальная часть энергии освобождается в ходе реакций, связанных с переносом электронов и при 3 реакциях субстратов с АДФ, называемых по этим соображениям фосфорилированиями на уровне субстратов. В ходе каждой из них образуется молекула АТФ, высокоэнергетического трифосфата.

Две реакции фосфорилирования проходят в гликолитической последовательности, во время окисления 3-фосфоглицеральдегида посредством НАД. Фермент, глицеральдегидфосфатдегидрогеназа, при участии НАД в качестве одного кофермента реагирует с субстратом, производя ацилфермент и НАД·Н₂. Ацилфермент образуется путем присоединения ацильной части окисленного глицеральдегид-3-фосфата к белку тиолэфирной связью, вероятно при содействии второго кофермента, глутатиона. Деятельная ацильная группа реагирует непосредственно с фосфатом, образуя карбоксидифосфат, высокоэнергетическое соединение.

Реактивный карбоксилфосфат реагирует, в присутствии особого фермента, с АДФ следующим образом:

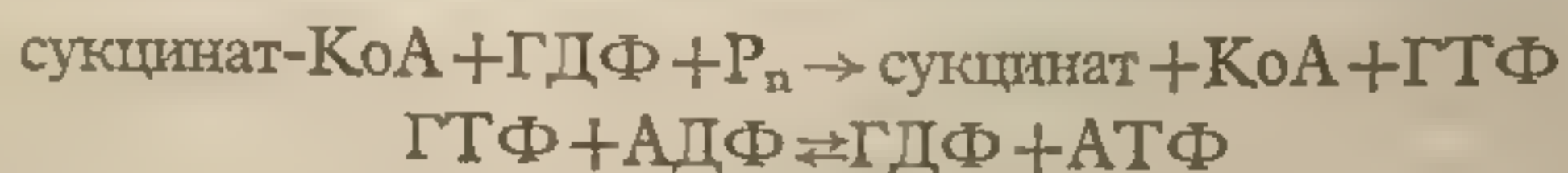


Фермент является специфической трансферазой.

Реоксидация НАД·Н₂ через цепь митохондриальных окислений дает 3 добавочные молекулы АТФ.

Вторым фосфорилированием на уровне субстрата является гидратация 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват. В реакции, катализируемой пируваткиназой, в присутствии ионов Mg⁺⁺, фосфатный остаток переносится на АДФ с образованием АТФ.

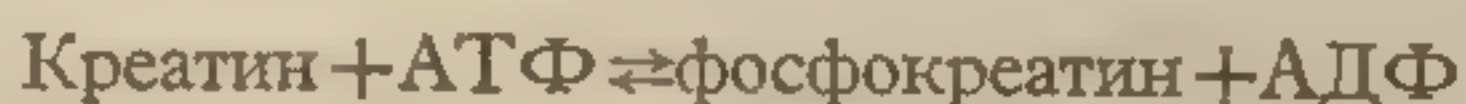
Третья реакция фосфорилирования на уровне субстрата представляет собой фосфорилирование ГДФ посредством сукцинат-КоА в присутствии Mg⁺⁺, а также перенос фосфатной группы с ГТФ на АДФ. Ход реакции, катализируемой двумя фосфотрансферазами, имеет следующий вид:



ХРАНИЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ

Энергия окисления углеводов, жиров и аминокислот накапливается в форме химической энергии высокоэнергетических соединений. К ним принадлежат фосфатные эфиры с одной или двумя пирофосфатными связями, ацилфосфаты, соединения с тиоэфирной связью (например ацил-КоА) и фосфоенолпируват. Из них, по количеству, первое место занимает АТФ, наиболее устойчивое вещество, находящееся во всех клетках в относительно высокой концентрации, по сравнению с другими коферментами.

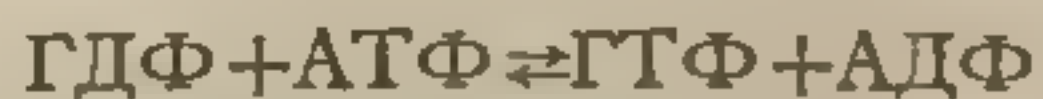
Второй формой накопления энергии, особенно при ее избытке, является фосфокреатин, образующийся из АТФ под влиянием креатинкиназы.



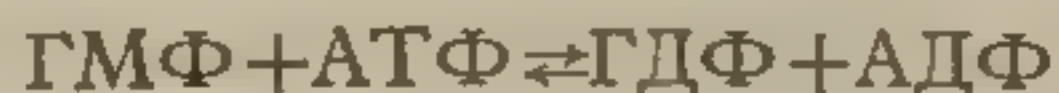
Эта реакция обратима; она поддерживает уровень АТФ в митохондриях и в специализированных биохимических системах (например в мышцах) в случае истощения запаса АТФ при повышенном расходе энергии.

Рядом с АТФ встречаются многие другие полифосфаты, как ЦТФ, УТФ, ИТФ, ГТФ, которые вместе взятые составляют лишь несколько процентов общего количества полифосфатов. Они необходимы для ряда реакций синтеза, в которых они выступают в качестве активаторов различных метаболитов за счет распада одной из пирофосфатных связей. Их резерв постоянно пополняется посредством реакций передачи фосфатной группы с АТФ на дифосфаты соответствующих нуклеозидов.

Примером таких реакций передачи, во время которых образуются высокоэнергетические фосфаты, может служить фосфорилирование гуанозиндифосфата (ГДФ):



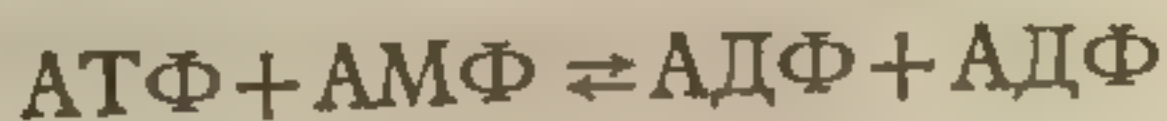
Если реакция исходит из гуанозинмонофосфата (ГМФ), вышеприведенной реакции должна предшествовать следующая:



Аналогично протекают реакции с другими нуклеозидами, моно- и дифосфатными.

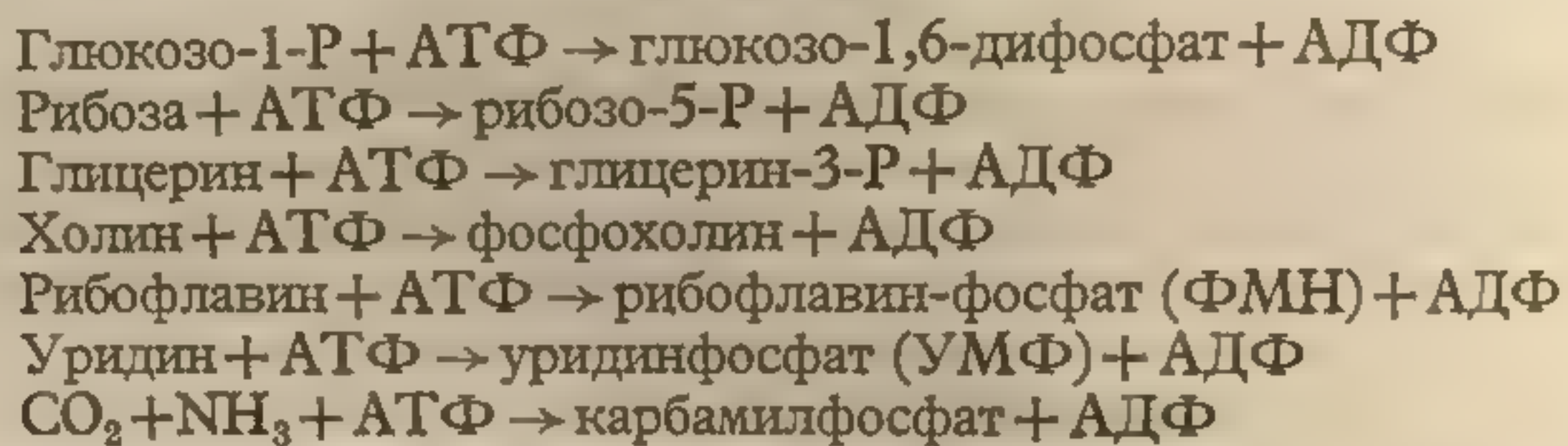
Эти реакции обратимы. Благодаря этим процессам возникают необходимые формы нуклеотидных коферментов.

Взаимоотношение уровней АТФ и АДФ в клетках, как правило, колеблется в узких пределах. В случае отклонений от нормы, вызываемых увеличенным потреблением или подвозом, пропорция восстанавливается при помощи рас пространенного фермента аденилаткиназы, катализирующей реакцию:

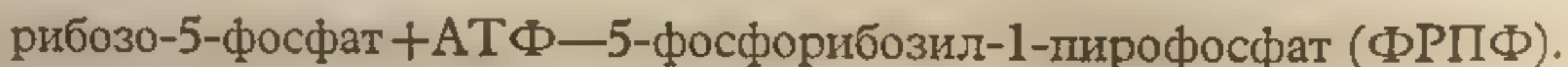


Реакции, использующие свободную энергию распада высокоэнергетических соединений, весьма многочисленны. Их разделяют на несколько групп, в зависимости от функции, выполняемой данным нуклеотидным коферментом.

Первую группу составляют реакции, катализируемые фосфотрансферазами (киназами), переносящими последнюю фосфатную группу с донора, которым служит АТФ, на акцептор. При этом образуется АДФ. Для лучшего понимания механизма этих реакций приводим пару примеров:

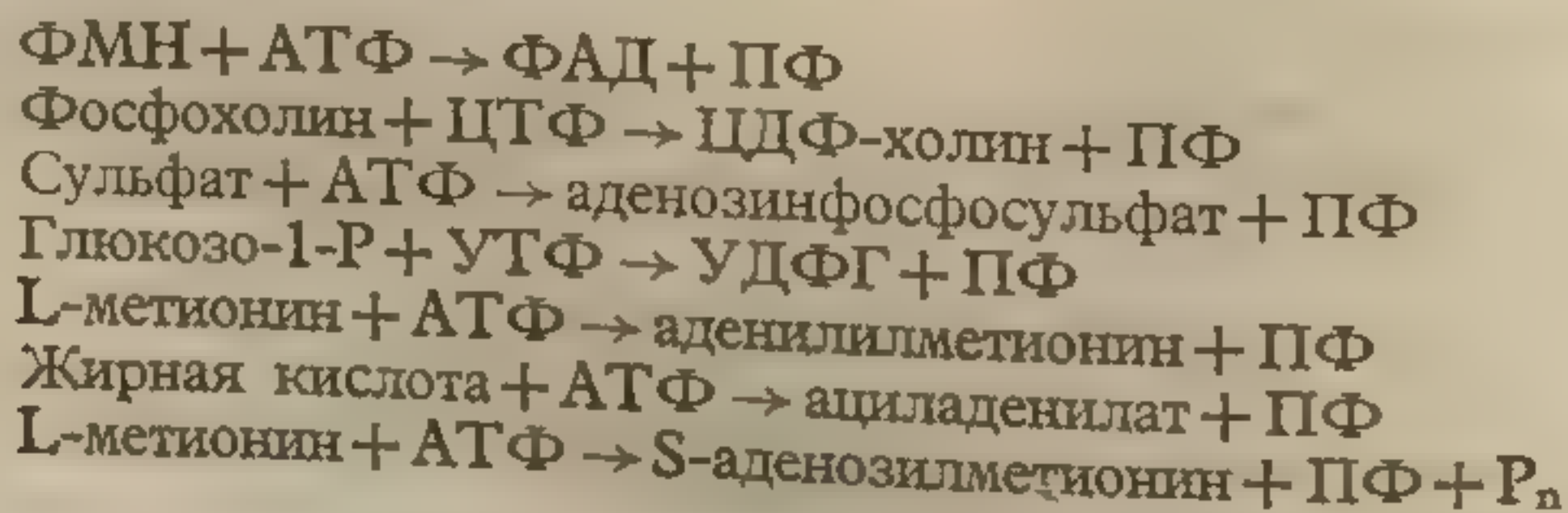


Ко второй группе принадлежат реакции, в которых переносится пиррофосфатная группа, например:

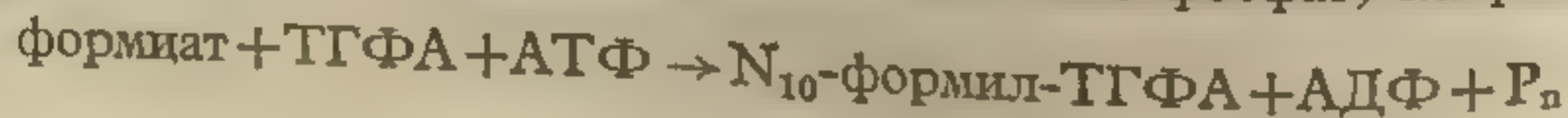


Их катализируют пиррофосфотрансферазы.

Большая группа реакций относится к переносу нуклеотида с донора, т.е. нуклеозидтрифосфата, на акцептор, которым служат жирные кислоты, аминокислоты, сахарно-фосфатные эфиры и т.п., причем они переводятся в активные формы. Ввиду того, что при этой реакции разрывается внутренняя пиррофосфатная связь и отщепляется пиррофосфат, эти реакции считались пиррофосфороллизом. Однако, более правильно называть эти реакции реакциями переноса нуклеотидильного остатка, а ферменты — нуклеотидилтрансферазами. Примеры пиррофосфороллиза:



Наконец, метаболиты могут активироваться посредством АТФ, причем энергия распада АДФ используется для получения реактивного соединения, но акцептором фосфатного остатка служит вода, а не активируемое соединение. В таком случае появляется неорганический фосфат, например:



Энергия
с синтезом
глутамата

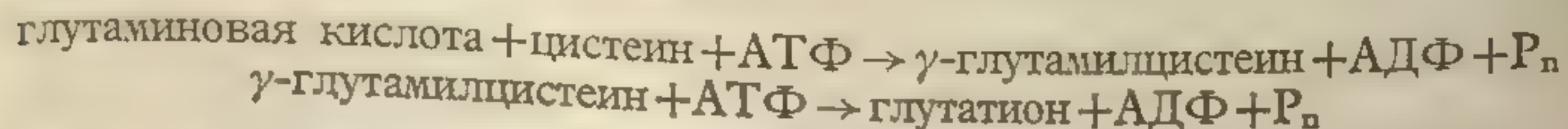
Фермент
Синтез
помощи
нием пи
стр. 118)
5-фосф
ческим со
связью от
диновых
тез нукле
Активир
вый этап
фатную г

Сульфо

Это т.н.
с фенолам

1. Payen
3. Fischer E.
J. biol. Chem.
(2 изд.), Col
1930. — 7a.
Z. physiol. C
78, 369, 1960
11. Michael
Proc. Natl. A
Oxford, 1940
Wade R. D.,
teinchem. 7,
1959. — 17.
Brauson H. R.
Acad. Sci., 37
21. Eyring
(Mc Elroy W.
Walter J. E.,
Sci, 44, 98, 19
1954. — 25.
Press, New Y
Biophys. Acta
547, 1957. —
mistry, 1961.
I. M., Walker
S. F.: J. biol.
31. Schlenk
Press, New Y
a. Myrback, K
Jauregg Th.,
Harris R. S.
The Enzymes
York, 1960. —
Enzymes 1960.

Энергия распада АТФ на АДФ и Р_n может покрыть затраты, связанные с синтезом новой связи, как например:

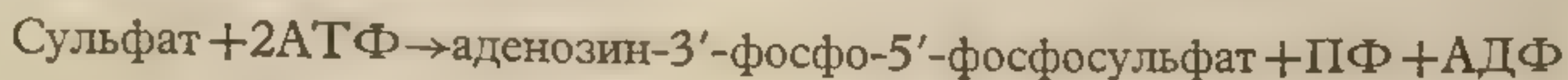


Ферменты принадлежат к классу лигаз (синтетаз).

Синтез нуклеиновых кислот происходит, в зависимости от их рода, при помощи двух механизмов переноса нуклеотидильных групп, или с отщеплением пирофосфата, или же с отщеплением неорганического фосфата (см. стр. 118).

5-фосфорибозил-1'-пирофосфат (ФРПФ) можно считать высокоэнергетическим соединением, которому была передана энергия вместе с пирофосфатной связью от АТФ. Он реагирует ферментативно с рядом пуриновых и пиримидиновых оснований, образуя соответствующие нуклеотиды (у бактерий). Синтез нуклеотидов (у животных) начинается реакцией с глутамином (см. стр. 118).

Активация сульфата требует 2 молекул АТФ и проходит в два этапа. Первый этап создает аденозин-5-фосфосульфат, второй вводит добавочную фосфатную группу в положение 3.



Это т.н. „активный сульфат“ (см. стр. 32), реагирующий непосредственно с фенолами, аминами и стеролами и дающий сернокислые эфиры.

ЛИТЕРАТУРА

1. Payen A., Persoz J. F.: Ann. Chem. (Phys.), 53, 73, 1833. — 2. Kirchhoff G. S.: 1814. — 3. Fischer E.: Ber. dtsch. chem. Ges., 27, 2985, 1894. — 4. Willstaetter, 1922. — 5. Sumner J. B.: J. biol. Chem., 69, 453, 1926. — 6. Northrop J. H., Kunitz M., Herriot R. M.: Crystalline Enzymes (2 изд.), Columbia University Press N. Y. 1948. — 7. Northrop J. H.: J. Gen. Physiol., 13, 739, 1930. — 7a. Sumner J. B., Dounce A. W.: J. Biol. Chem., 121, 417, 1937. — 8. Baranowski T.: Z. physiol. Chem., 260, 43, 1939. — 9. Harden A., Young W. J.: Proc. Roy. Soc. B., 77, 405, 78, 369, 1960. — 10. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z., 266, 377, 1933. — 11. Michaelis L., Menten M. L.: Bioch. Z., 49, 333, 1913. — 12. Beadle G. W., Tatum E. L.: Proc. Natl. Acad. Sci., 33, 155, 1941. — 13. Svedberg T., Pedersen K. O.: The Ultracentrifuge, Oxford, 1940. — 14. Morawiecki A.: Bioch. Biophys. Acta, 44, 604, 1960. — 15. Dreyer W. J., Wade R. D., Neurath H.: Arch. Biochem. Biophys., 59, 145, 1955. — 16. Sanger F.: Adv. Proteinchem. 7, 1, 1952. — 16a. Marker C. W., Moeller F.: Proc. natl. Acad. Sci. U. S., 45, 753, 1959. — 17. Koshland D. E. Jr.: Adv. Enzymol., 22, 45, 1960. — 18. Pauling L., Corey R. B., Brause H. R.: Proc. Natl. Acad. Sci., 37, 205, 1951. — 19. Pauling R., Corey R. B.: Proc. natl. Acad. Sci., 37, 235, 37, 241, 729, 1951. — 20. Pauling R., Corey R. B.: Nature, 168, 550, 1951. — 21. Eyring N., Lumry R., Spikes J. D.: A Symposium on the Mechanism of Enzyme Action (Mc Elroy W. D. a. Glass B. eds.) John Hopkins Press, Baltimore, 1954. — 22. Kautzmann W. J., Walter J. E., Eyring H.: Chem. Revs., 26, 339, 1940. — 23. Koshland D. E. Jr.: Proc. Natl. Acad. Sci., 44, 98, 1958. — 24. Neurath H., Bailey K.: The Proteins, Academic Press, New York, 1953. — 25. Linderstrom-Lang K. U., Schellman J. A.: The Enzymes sec. ed., 1, 443, Academic Press, New York, 1959. — 26. Baranowski T., Illingworth B., Brown D. H., Cori C. F.: Bioch. Biophys. Acta, 25, 16, 1957. — 26a. Cori C. F., Illingworth B.: Proc. Natl. Acad. Sci. V. S. 43, 547, 1957. — 27. Theorell H.: Symposium IV, preprint 217, V International Congress of Biochemistry, 1961. — 28. Theorell H., Bonnichsen R.: Acta chem. scand., 5, 1105, 1951. — 29. Klotz I. M., Walker F. M., Pivan R. B.: J. Am. chem. Soc., 68, 1486, 1946. — 30. Hayes J. E., Velick S. F.: J. biol. Chem., 207, 225, 1954. — 31. Schlenk F.: The Enzymes (Sumner J. B. a. Myrback K., eds.) Vol. II, Part I, 256, Academic Press, New York, 1957. — 32. Kaplan N. O.: The Enzymes, sec. ed. (Boyer P. D., Lardy H. a. Myrback, K., eds.), Vol. 3, 105, Academic Press, New York, 1960. — 33. Harris R. S., Wagner J. A., Jauregg Th., Horwitt M. K., Hegsted D. M., Snell E. E.: The Vitamins (Sebrell W. H., Jr. a. Harris R. S. eds.), Vol. III, 299, Academic Press, New York, 1954. — 34. Beinert H.: The Enzymes (Boyer P. D., Lardy H. a. Myrback K., eds.), Vol. 3, 339, Academic Press, New York, 1960. — 35. Jancarik A.: Vitamine u. Hormone, 7, 43, 1957. — 36. Metzler D. E.: The Enzymes 1960, Vol. 2, 295, 1960. — 37. Lohmann K., Schuster P.: Biochem. Z., 294, 188, 1937. —

38. Breslow R.: J. Am. Chem. Soc., 80, 3719, 1958. — 39. Braunstein A. E.: The Enzymes Vol. 2, 113, 1960. — 40. Braunstein A. E.: Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry 1957, Tokyo-Kyoto, 135, Maruzen, Tokyo, 1958.
41. Jaenicke L., Lynen F.: The Enzymes, Vol. 3, 3, 1960. — 42. Lynen F., Reichert E.: Angew. Chem., 63, 47, 1951. — 43. Reed L. J.: The Enzymes, Vol. 3, 195, 1960. — 44. Rabinowitz J. C.: The Enzymes, Vol. 2, 185, 1960. — 45. Huennekens F. M., Osborn M. J.: Adv. Enzymol., 21, 369, 1959. — 46. Colowick S., Lazarow E., Racker E., Schwartz D. R., Stadtman E., Waelsch H.: Glutathione. Academic Press, New York, 1954. — 47. Crook E. M.: Symposium on Glutathione. Biochem. Symposia (Cambridge, Engl.); No 16, 1959. — 48. Knox W. E.: The Enzymes Vol. 2, 253, 1960. — 49. Paul K. G.: как выше, Vol. 3, 277, 1960. — 50. Dixon M., Webb E. C.: The Enzymes, 410. Longmans, Green and Co, London, 1958.
51. Paul K. G.: Acta Chem. Scand., 13, 1239, 1959. — 52. Vallee B. J.: The Enzymes как выше, Vol. 3, 225, 1960. — 53. Wold F., Ballou C. E.: J. Biol. Chem., 227, 301, 1957. — 54. Leloir L. F., Cardini C. E.: The Enzymes как выше, Vol. 2, 39, 1960. — 55. Kennedy E. P.: как выше, Vol. 2, 63, 1960. — 56. Utter M. F.: как выше, Vol. 2, 75, 1960. — 57. Bock R. M.: The Enzymes, как выше, Vol. 2, 3, 1960. — 58. Schwimmer S., Pardee A. B.: Adv. Enzymol., 14, 375, 1953. — 59. Colowick S. P., Kaplan N. D.: Methods in Enzymology. Vol. 1, Academic Press, New York. — 60. Northrop J. H., Kunitz M., Herriot R. M.: Crystalline Enzymes (2 изд.). Columbia University Press, New York, 1948.
61. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris, 1961. — 62. Briggs G. E., Haldane J. B. S.: Biochem. J., 19, 338, 1925. — 63. Hearon J. Z., Bernhard S. A., Friess S. L., Botts D. J., Morales F. M.: The Enzymes 1959, как выше, Vol. 1, 49. — 64. Alberty R. A.: Adv. Enzymol., 17, 1, 1956. — 65. Dixon M., Webb E. G.: Enzymes, 19, Longmans, London, 1958. — 66. Lineveaver H., Burk D.: J. Amer. chem. Soc., 56, 658, 1934. — 67. Augustinsson K. B.: Acta physiol. scand., 15, Suppl. 52, 1948. — 68. Chance B.: Techniques of Organic Chemistry, Vol. 8, 1953. — 69. Dixon M.: Biochem. J., 55, 170, 1953. — 70. Wilson I. B., Bergmann F., J. biol. Chem., 186, 683, 1950.
71. Dixon M.: Biochem. J., 55, 161, 1953. — 72. Laidler K. J. (1955): Trans. Faraday Soc., 51, 528, 540, 550. — 73. Vallee B. L.: The Enzymes, 2 изд. (Boyer P. D., Lardy H. a. Myrback K. eds.), Vol. 3, 225, Academic Press, New York, 1960. — 74. Dixon M., Webb E. C.: см. пункт 3, 151, 1958. — 75. Bodansky O.: J. biol. Chem., 129, 197, 1939. — 76. Huennekens F.: Techniques of Organic Chemistry, Vol. 8, 610, Interscience, New York 1953. — 77. Eyring H., Lumry R., Spikes J. D.: Mechanism of Enzyme Action, John Hopkins Press, Baltimore, 1954. — 78. Ingold C. K.: J. Chem. Soc., 2991, 1954. — 79. Massey V.: Biochem. J., 53, 72, 1953. — 80. Anson M. L., Mirsky A. E.: J. gen. Physiol., 17, 393, 1934.
81. Bray H. G., White K.: Kinetics and Thermodynamics in Biochemistry, Churchill, London, 1957. — 82. McElroy W. D., Glass B.: The Mechanism of Enzyme Action. John Hopkins Press, Baltimore, 1954. — 83. Laidler K. J.: An Introduction to the Chemistry of Enzymes. Mc Graw-Hill, London 1954. — 84. Haldane J. B. S.: Enzymes, Longmans, London 1930. — 85. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K.: The Enzymes, 2 изд., 1959. — 86. Hoffmann-Ostenhof O.: Enzymologie. Springer, Wien., 1954. — 87. Gutfreund H.: The Enzymes, как выше, Vol. 1, 233, 1959. — 88. Boyer P. D.: Ann. Rev. Biochem., 29, 15, 1960. — 89. Boyer P. D., Lardy H. A. D. E. Jr.: J. Cellular Comp. Physiol., 47, Suppl. 1, 217, 1956.
91. Najder V. A., Pullman M. E.: Science, 119, 631, 1954. — 92. Koshland D. E. Jr., Erwin M. J.: J. Am. Chem. Soc., 79, 2657, 1957. — 93. Pizer L. I.: J. Am. Chem. Soc., 80, 4431, 1958. — 94. Balls A. K., Jansen E. F.: w Adv. Enzymol., 13, 321, 1952. — 95. Gladner J., Laki K.: J. Am. Chem. Soc., 80, 1263, 1958. — 96. Jansen E. F., Nutting M. D. F., Jang R., Balls A. K.: J. biol. Chem., 179, 189, 1949. — 97. Jansz H. S., Posthumus C. A., Cohen J. A.: Biochim. Biophys. Acta, 33, 387, 396, 1959. — 98. Oosterbaan R. A., Junst G., Van Rotterdam J., Cohen J. A.: Biochim. Biophys. Acta, 27, 549, 556, 1958. — 99. Koshland D. E. Jr.: Adv. Enzymol., 22, 45, 1960. — 100. Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H.: J. biol. Chem., 235, 633, 1960.
101. Spackmann D. H., Stein W. H., Moore S.: J. biol. Chem., 235, 648, 1960. — 102. Reifield R. R., Anfinsen C. B.: J. biol. Chem., 221, 385, 1956. — 103. Koshland D. E. Jr.: The Enzymes (Boyer, Lardy a. Myrback eds.). 2 изд., Vol. 1, 305, Academic Press, New York 1959. — 104. Eyring H.: Chem. Rev., 17, 65, 1935. — 105. Eyring H.: Chem. Rev., 17, 65, 1935. — 106. Laidler K. J., Eyring H.: The Theory of Rate Processes, Mc Graw-Hill, New York 1941. — 107. Alberty R. A., Pierce W. R.: J. Am. chem. Soc., 79, 1526, 1957. — 108. Wilson I. B.: The Mechanism of Enzyme Action (Mc Elroy a. Glass eds.), 642. John Hopkins Press, Baltimore 1954. — 109. Lumry R.: The Enzymes (Boyer, Lardy a. Myrback eds.). 2 изд., Vol. 1, 157. Academic Press, New York, 1959. — 110. Lawrence W., Moore W. J.: J. Am. Chem. Soc., 73, 3973, 1951. — 111. Kunitz M.: J. gen. Physiol., 32, 241, 1948.
112. Krebs H. A.: Biochem. J., 54, 82, 1953. — 113. Burton K.: Biochem. J., 59, 44, 1955. — 114. Anfinsen C. B., Kielley W. W.: Ann. Rev. Biochemistry, 23, 17, 1954. — 115. Johnson M. J.: The Enzymes Vol. 3, 420, 1960. —

116. Hartley B. S.: Biochem. J., 64, 27P, 1956. — 117. Todrick A.: Brit. Pharmacol., 9, 76, 1954. — 118. Marrack J. R.: The Enzymes (Sumner a. Myrbäck eds.) Vol. 1, 343, Academic Press, New York 1951. — 119. Ames B. N.: J. Biol. Chem., 228, 131, 1957. — 120. Lehninger A. L.: Physiol. Rev., 30, 393, 1950.
121. Bach S. J., Whitehouse D. B.: Bioch. J., 57, 1954. — 122. Neurath H., Dreyer W. J.: Discussions Faraday Soc., 20, 32, 1955. — 123. Jacobsen C. F.: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg, Ser. chim. 25, 325, 1947. — 124. Neurath H., Gladner J. A., Davie E. W.: The Mechanism of Enzyme Action (Mc Elroy a. Glass eds.) 50. John Hopkins Press, Baltimore 1954. — 125. Gladner J. A., Neurath H.: J. biol. Chem., 206, 911, 1954. — 126. Ravery M., Poilroux M., Yoshida A., Desnuelle P.: Biochim. Biophys. Acta, 23, 608, 1957. — 127. de Duve C., Berthet J.: Int. Rev. Cytol., 3, 225, 1954. — 128. Dounce A. W.: The Enzymes (Sumner a. Myrbäck eds.), Vol. 1, 187. Academic Press, New York, 1951. — 129. Green D. E.: Adv. Enzymol., 21, 73, 1959. — 130. Dixon M., Webb E. C.: Enzymes, 630, Longmans, London 1958.
131. Bücher Th., Klingenberg: Angew. Chem., 70, 552, 1958. — 132. Potter V. R.: Enzymes, Growth, and Cancer. Thomas, Springfield Illinois, 1950. — 133. Hechter O.: Vitamins and Hormones, 13, 293, 1955. — 134. Knox W. E., Auerbach V. H., Lin E. C. C.: Physiol. Revs., 36, 164, 1956. — 135. Muller G. C.: Cancer Research, 17, 490, 1957. — 136. Villet C. A., Hagerman D. D., Joel P. B.: Recent Progr. Hormone Research, 16, 49, 1960. — 137. Haynes R. C. Jr., Sutherland E. W., Rall T. W.: Recent Progr. Hormone Research, 16, 121, 1960. — 138. Adelberger E. A., Umbarger H. E.: J. biol. Chem., 205, 475, 1953. — 139. Parr C. W.: Nature, 178, 1401, 1956. — 140. Dixon M.: Multienzyme Systems. Cambridge University Press 1949.
141. Aisenberg A. C., Potter V. R.: J. biol. Chem., 224, 115, 1957. — 142. Cohen G. N., Monod J.: Bacteriol. Revs., 21, 169, 1957. — 143. Pardee A. B.: The Enzymes, 2 изд. (Boyer, Lardy a. Myrbäck, eds.), Vol. 1, 681. Academic Press, New York, 1959. — 144. Crick F. H. C.: Symposia Soc. Exptl. Biol. (London), 12, 138, 1958. — 145. Ingram V. M.: Nature, 183, 1795, 1959. — 146. Garen A., Levinthal C.: Biochim. Biophys. Acta, 38, 470, 1960. — 147. Maas K. W., Davis B. D.: Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A., 38, 785, 1952. — 148. Horowitz N. H., Fling M.: Genetics, 38, 360, 1953. — 149. De Busk A. G.: Adv. Enzymol., 17, 393, 1956. — 150. Horowitz N. H., Fling M., MacLeod J. L., Sueoka N.: Genetics, 44, 516, 1959.
151. Yanofsky C., Bonner D. M.: Genetics, 40, 761, 1955. — 152. Suskind S. R., Yanofsky C., Bonner D. M.: Genetics, 41, 577, 1955. — 153. Suskind S. R., Jordan E.: Science, 129, 1614, 1959. — 154. Yanofsky C., Crowford I. P.: Proc. natl. Acad. Sci. U. S., 45, 1016, 1959. — 155. Kalow W., Staron N.: Can. J. Biochem. Physiol., 35, 1305, 1957. — 156. Kalow W., Davies R. O.: Biochem. Pharmacology, 1, 183, 1958. — 157. Kalow W., Genest K.: Can. J. Biochem. Physiol., 35, 339, 1957. — 158. Fincham J. R. S.: Biochem. J., 65, 721, 1957. — 159. Kutahashi K.: Science, 125, 114, 1957. — 160. Fincham J. R. S.: Ann. Rev. Biochem., 28, 343, 1959.
161. Fincham J. R. S.: Adv. Enzymol., 22, 1, 1960. — 162. Pateman J. A., Fincham J. R. S.: Heredity, 12, 317, 1958. — 163. Cohn M., Monod J.: Adaptation in Microorganisms, Cambridge University Press, 1953. — 164. Pollock M. R., Kramer M.: Biochem. J., 70, 665, 1958. — 165. Jacob F., Monod J.: Vth Intern. Congres of Biochemistry, Symposium 1, preprint 91, 1961. — 166. Jacob F., Monod J.: C. R. Acad. Sci., 249, 1282, 1959. — 167. Pollock M. R.: The Enzymes, как выше, Vol. 1, 619, 1959.

ФИЗИ ОПР

При и
имущест
комендуе
всегда п
териале.
содержат
тативные
ментатив
лению. I
не всегда
дуемом м
вия пере
для изме
тем, что
фермент
фермента
исследует
превраще
не распо
ствии зн
условии
активности
кристалл
кими фе
полученн
мощи точ
При оп
методами
метрия, с
рость по
исчезнове
меряемая
мерой ак
методам,
вязкости,
метричес
При оп
условия.

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МЕТОДЫ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ****ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ**

MARIAN ORŁOWSKI

При исследовании ферментативных процессов предметом испытания преимущественно является скорость реакции, а не концентрация фермента. Рекомендуется помнить, что измеряемая скорость ферментативной реакции не всегда пропорциональна количеству фермента в данном биологическом материале. Это объясняется тем, что биологические жидкости и ткани часто содержат соединения, ускоряющие или замедляющие определенные ферментативные реакции, и что влияние этих веществ на измеряемую скорость ферментативной реакции не всегда поддается исключению или точному определению. Поэтому понятие большей или меньшей ферментативной активности не всегда совпадает с большей или меньшей концентрацией фермента в исследуемом материале. Многие ферменты пребывают в неактивной форме, и условия перехода из неактивной в активную форму могут иметь решающее значение для измеряемой ферментативной активности. Положение еще осложняется тем, что биологический материал обычно содержит не один, а целую группу ферментов. На субстрат действует сразу несколько ферментов, а продукт ферментативной реакции, количество которого является мерой активности исследуемого фермента, может подвергаться дальнейшим ферментативным превращениям и тем самым исчезает из реакционной среды. Наука до сих пор не располагает методами количественного определения ферментов в присутствии значительного количества других белковых веществ. Только при условии тщательной очистки ферментных препаратов можно на основании активности заключать о количестве фермента. Иногда, располагая чистыми кристаллическими препаратами ферментов, например такими протеолитическими ферментами, как пепсин, трипсин, химотрипсин, можно сравнивать полученные данные со стандартной кривой активности, построенной при помощи точно определенных по весу количеств фермента.

При определении активности ферментов пользуются всеми классическими методами аналитической химии. Применяются: анализ титрованием, колориметрия, спектрофотометрия, газометрия и другие. Чаще всего исследуют скорость появления продукта ферментативной реакции, или, реже, скорость исчезновения вещества, подвергающегося превращению. Эта скорость, измеряемая количеством превращаемого соединения в единицу времени, служит мерой активности фермента. Нередко измеряют активность ферментов по методам, заимствованным у физической химии, как например определение вязкости, помутнения, а также при помощи полярометрического, потенциометрического и других способов.

При определении активности ферментов необходимо соблюдать заданные условия. Определение производят при постоянной температуре, постоянном,

В присутствии избытка триозофосфатизомеразы и фермента Baranowski (α -глицерофосфатдегидрогеназа) и $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ мерой активности альдолазы является скорость окисления $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$.

Коэффициент экстинкции для $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ равняется при 340 $\text{m}\mu$ $6,22 \times 10^6$ $\text{см}^2/\text{моль}$. Это значит, что 1 $\mu\text{моль}$ $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$, растворенный в 1 мл, обуславливает поглощение света с длиной волны 340 $\text{m}\mu$, на пути в 1 см, на $\log I_0/I = 6,22$. Если объем реакционной смеси равен 3 мл, экстинкция 1 $\mu\text{моля}$ $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ в 3 мл составляет $6,22 : 3 = 2,07$.

Такие же пересчеты относятся к реакциям, в которых роль кофермента играет НАДФ. В некоторых фотометрах для измерения реакций, протекающих с участием пиридиновых нуклеотидов, пользуются полосой Hg с длиной волны 366 $\text{m}\mu$. Экстинкция $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ при этой длине волны меньше экстинкции при 340 $\text{m}\mu$. Для пересчета с одной экстинкции на другую принимают во внимание следующую зависимость:

$$E_{340 \text{ m}\mu}^{\text{НАД}\cdot\text{H}_2} = 1,89 \times E_{366 \text{ m}\mu}^{\text{НАД}\cdot\text{H}_2}$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В СЫВОРОТКЕ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

Большинство исследований ферментов, которыми пользуются клинические лаборатории, производится в сыворотке, моче, спинномозговом ликворе — реже в других биологических жидкостях — транссудатах и экссудатах. Несмотря на то, что до сих пор физиологическое значение большинства ферментов плазмы неизвестно, исследование их активности приобрело значение для диагностики многих болезней. Поэтому в настоящей главе отводится главное место методике исследования активности ферментов в плазме или в сыворотке.

Активность ферментов в плазме обычно весьма невелика в сравнении с активностью тех же ферментов в тканях. Количество ферментативно активного белка составляет в плазме лишь небольшую часть общего количества белка плазмы, пассивного в ферментативном отношении. Ферментативно пассивные белки могут оказывать тормозящее или стимулирующее влияние на некоторые ферментативные реакции. Известно, например, что в сыворотке имеются ингибиторы многих ферментов, в частности трипсина, химотрипсина, гиалуронидазы. Кроме того, некоторые белки активируют ферментативные реакции. И так альбумины активируют липопроteinлипазу.

Активность ферментов в форменных элементах крови в лейкоцитах и в эритроцитах, обычно во много раз превышает активность ферментов в плазме или сыворотке. По этим соображениям, даже следы гемолиза могут существенным образом изменить результаты определения активности ферментов сыворотки. Если учесть, что не кровяные тельца, а разные ткани и органы являются главным источником ферментов, обнаруживаемых в плазме, то становится понятным, что исследование активности ферментов в плазме с гемолизом может привести к ошибкам.

При исследовании активности ферментов в плазме больных необходимо помнить, что некоторые лекарственные средства влияют на результаты определений. Так салицилаты могут повышать активность трансаминазы плазмы, а опиаты иногда увеличивают активность амилазы. Антикоагулянты, прибавляемые к пробе крови, также могут повлиять на определение ферментативной активности. Наблюдаются колебания ферментативной активности в плазме в зависимости от времени дня, рода и времени приема пищи.

При определении активности ферментов с участием НАД·Н₂ следует помнить, что сыворотка содержит некоторое количество физиологических субстратов и, наряду с этим, действующие на них ферменты (например пири-виноградная кислота и лактатдегидрогеназа). Это вызывает окисление НАД·Н₂, после введения последнего, без поступления субстрата извне. Эти реакции через некоторое время прекращаются, например если находящиеся в сыворотке кетокислоты полностью восстановятся. Поэтому при спектрофотометрии ферментов сыворотки с участием НАД·Н₂ или НАДФ·Н₂ необходимо ждать конца этих реакций прежде, чем приступить к добавлению соответствующего субстрата.

Активность ферментов плазмы выражают в т.н. единицах, которые обычно указывают количество превращенного субстрата в единицу времени. Они условны; их величина зависит от применяемого автором метода. Поэтому иногда для одного и того же фермента существует столько разных единиц, сколько имеется способов определения его активности. Это неминуемо ведет к затруднениям при сравнении результатов, полученных разными исследователями, пользующимися различными методами. Необходимо унифицировать единицы активности ферментов сыворотки. Несколько лучше обстоит дело в области ферментов, активность которых определяется по спектрофотометрическому методу Warburg. Эти методы пользуются по большей части следующими единицами:

Единица, рекомендуемая Wróblewski и сотр., представляет собой активность фермента в 1 мл сыворотки, способного при температуре 25° вызвать изменение экстинкции НАД в течение 1 минуты на 0,001 при 340 мμ. Объем реакционной смеси равняется при этом 3 мл, а толщина слоя жидкости в измерительной кювете 1 см. Следовательно, при измерениях в диапазоне 340 мμ

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 1000 = \text{единицы},$$

а при измерениях в диапазоне 366 мμ

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 1000 \times 1,89 = \text{единицы}.$$

Единица, введенная Bücher, представляет собою активность фермента, вызывающую при температуре 25° изменение НАД при 366 мμ на 0,100 в продолжение 100 секунд, при объеме 1 мл и толщине измерительной кюветы в 1 см. В этих условиях это означает превращение 0,030 μмоля/мл, или 20,1 μг НАД. При длине волны 366 мμ это значит:

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times \frac{1}{60/100 \times 1/10 \times 1/3} = \Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 50 = \text{единицы},$$

при определении в диапазоне 340 мμ:

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times \frac{1}{60/100 \times 1/10 \times 1/3 \times 1,89} = \Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 26,5 = \text{един.}$$

Многие авторы пользуются единицами, выражающими число μмолей превращенного субстрата в продолжение часа в мл сыворотки. При измерениях в диапазоне 340 мμ и при конечном объеме реакционной смеси 3 мл это соответствует:

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 60 \times 0,483 = \Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 29,0 = \text{единицы}.$$

При измерениях в диапазоне 366 мμ и конечном объеме 3 мл:

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 60 \times 0,483 \times 1,89 = \Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 55,0 = \text{единицы}.$$

В последнее время рекомендуют создание международной единицы (IU), соответствующей превращению 1 μ моля субстрата в продолжение минуты в 1000 мл плазмы или тканевого экстракта, при температуре 25° (73, 99, 167). При измерении в диапазоне 340 м μ , при конечном объеме 3 мл, толщине кюветы в 1 см и объеме испытуемой пробы в 1 мл:

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 1000 \times 0,483 = \Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 483 = \text{единицы (IU)}.$$

При тех же условиях, в диапазоне 366 м μ :

$$\Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 1000 \times 0,483 \times 1,89 = \Delta E/\text{мин}/\text{мл} \times 913 = \text{единицы (IU)}.$$

Для ясности мы приводим по Richterich и сотр. (167) таблицу, при помощи которой можно быстро производить пересчет с одних единиц на другие.

Таблица пересчета разных единиц, применяемых при спектрофотометрии с НАД или НАДФ (167)

Данная величина	Искомая величина			
	$\frac{\mu\text{моль}}{\text{час.}/\text{мл}}$	$\frac{\mu\text{моль}/\text{мин}}{1000 \text{ мл}}$	един. Wróblewski	един. Bücher
$\mu\text{моль}/\text{час.}/\text{мл}$	—	16,7	34,5	0,915
$\mu\text{моль}/\text{мин.}/1000\text{мл}$	0,060	—	2,07	0,055
ед. Wróblewski	0,029	0,483	—	0,027
ед. Bücher	1,097	18,29	37,7	—

Единицы, применявшиеся ранее при ферментных методах, легко пересчитать на международные единицы. Например, единица щелочной фосфатазы Bodansky означает освобождение 1 мг фосфора в течение 1 часа, под влиянием 10 мл сыворотки, из β -глицерофосфата натрия. По новым взглядам, 1 единица Bodansky = $\frac{1000}{31} \times \frac{1}{60} \times 10 \mu$ молей в минуту на литр сыворотки = 5,35 международных единиц.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ В ТКАНЯХ

Определение активности ферментов в тканях производится главным образом в гомогенатах и тканевых срезах; значительно реже представляется возможность исследовать активность в изолированных одиночных клетках или суспензиях одиночных клеток. Типичным объектом, в котором можно исследовать активность некоторых ферментных систем в суспензиях одиночных клеток является асцитный рак Эрлиха, а также искусственные экстракорпоральные культуры некоторых клеток.

За последние годы появилось много сообщений о ферментативных исследованиях на человеческих тканях, получаемых путем биопсии. Это относится в первую очередь к тканям печени, почки, селезенки и, реже, к другим тканям. Полученную ткань взвешивают, затем ее гомогенизируют в гомогенизаторе, чаще типа Potter-Elvehjem с заданным количеством физиологического раствора поваренной соли и хлористого калия или раствора сахарозы. Активность ферментов определяют либо в цельном, сыром гомогенате, т.е. гомогенате, содержащем все компоненты исследуемой ткани, либо после отделения центрифугированием ядер и клеточных мембран. Иногда цельный гомогенат подвергают фракционному центрифугированию, исследуя распре-

деление активности в получаемых клеточных фракциях, например в клеточных ядрах, митохондриях, микросомах, а также во фракции растворимых белков цитоплазмы.

Активность фермента в гомогенате может зависеть не только от его количества в исследуемой ткани. Сама процедура приготовления гомогената может существенным образом повлиять на результат определения активности. Это зависит м.пр. от герметичности гомогенизатора (зазор между поршнем и стенкой гомогенизатора), продолжительности гомогенизации и температуры. Поэтому для данного фермента необходимо всегда определить оптимальные условия гомогенизации. Во избежание денатурации фермента при растирании ткани между стенками гомогенизатора, прибор охлаждают льдом. Продолжительность гомогенизации играет существенную роль. Лактатдегидрогеназа печени переходит в раствор уже через минуту после начала гомогенизации, зато другие ферменты переходят медленнее. Промежуток времени от момента взятия ткани до определения ферментативной активности имеет нередко большое значение, многие ферменты *in vitro* быстро теряют свою активность, поэтому их необходимо исследовать сразу после получения гомогената. Примером такого фермента является глюкозо-6-фосфатаза, быстро теряющая активность даже на льду. Другие ферменты более устойчивы, некоторые сохраняют активность даже после долгого хранения.

При исследовании ферментативной активности необходимо помнить, что, помимо исследуемого фермента, в реакционной среде находится огромное количество других ферментов, а также известное число коферментов, обуславливающих дальнейшее превращение определяемого продукта реакции и приводящих к неверным результатам исследования. Источником ошибок при исследовании активности в гомогенатах может быть также присутствие крови.

Обычно определяют ферментативную активность гомогената по отношению к весу свежей или высушенной ткани. Ввиду того, что содержание воды в тканях непостоянно, выгоднее производить вычисление по отношению к содержанию в гомогенате белка или общего азота.

В последнее время стали с той же целью определять содержание дезоксирибонуклеиновой кислоты в тканях. Содержание ДНК в клеточном ядре постоянно для диплоидного ядра каждой клетки. Зная эту величину, можно определить число клеток в тканях, после чего измеряют активность из расчета на одну клетку.

В процессе гомогенизации структура клетки и ее организация подвергаются разрушению, происходит также разрыв клеточных мембран. Белковые молекулы, размещенные в клетке в определенном порядке, отрываются от своих мест и только некоторые клеточные структуры до известной степени остаются невредимыми. Последние можно изолировать из гомогената путем фракционирования (клеточные ядра, митохондрии, микросомы). Исследование активности ферментов в гомогенатах может, по вышеприведенным соображениям, в лучшем случае дать ориентировочные сведения о потенциальных ферментативных возможностях клетки, но не в состоянии отобразить истинную ферментативную активность клетки.

При исследовании активности ферментов в тканевых срезах структура клеток и тканей до некоторой степени сохраняет целостность. Эта техника была введена Warburg (200). Она пригодна для исследования сложных метаболических реакций и поликаталитических систем, как дыхание и гликолиз. Благодаря относительно небольшой травме, которой подвергается ткань во время приготовления среза, ферменты и ферментные системы дислоцированы в срезе приблизительно так же, как и в неповрежденной ткани, а меж-

клеточные барьеры в значительной степени сохранены. Благодаря этому обстоятельству исследование тканевых срезов оказывает большую помощь при прослеживании путей следования меченных метаболитов и субстратов. Ограниченное проникновение многих соединений через клеточные мембраны, с другой стороны, представляет серьезное препятствие для исследования многих ферментативных реакций по этому методу. Это относится также и к исследованиям, производимым во взвесах одиночных клеток. При вышеприведенных методах исключаются, как правило, все регулирующие, влияния, действующие в организме, как целом.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СПОСОБЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ

ФЕРМЕНТЫ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

MARIAN ORŁOWSKI

Не все ферменты углеводного обмена находятся в сыворотке. В ней не обнаружено активности (или она весьма небольшая) следующих ферментов углеводного обмена: фосфорилазы, гексокиназы, фосфогексокиназы, фруктозо-1-фосфат-альдолазы, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы, алкоголь-дегидрогеназы и других (90, 122, 170). Некоторые ферменты, лактатдегидрогеназа и фосфогексоизомеразы проявляют в сыворотке значительную активность.

ФОСФОГЛЮКОМУТАЗА (ФГМ)

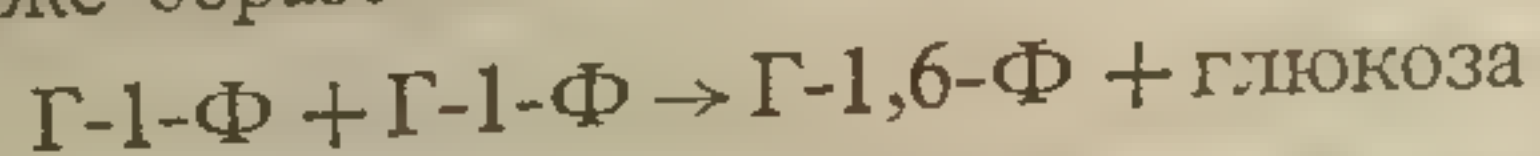
Этот фермент катализирует обратимое превращение глюкозо-1-фосфата (Г-1-Ф) в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф). Он широко распространен в тканях и клетках (55). В состоянии ферментативного равновесия имеется около 95% Г-6-Ф и около 5% Г-1-Ф. Молекулярная масса фермента составляет 74000. Для его полной активности необходимо присутствие ионов Mg^{++} и цистеина. Фториды сильно тормозят фермент. Сырые ферментные препараты также активируются ионами марганца и кобальта. Коферментом реакции, катализируемой ФГМ оказался глюкозо-1,6-дифосфат (Г-1,6-Ф) (52). Молекула фермента принимает участие в реакции, подвергаясь фосфорилированию (142) в соответствии со следующей схемой:

I этап глюкозо-1-фосфат + фосфофермент →
 → глюкозо-1,6-дифосфат + дефосфофермент

II этап глюкозо-1,6-фосфат + дефосфофермент →
 → глюкозо-6-фосфат + фосфофермент

Обыкновенные препараты Г-1-Ф, получаемые ферментативным путем, содержат достаточное количество Г-1,6-Ф в виде загрязнений так, что реакция проходит без добавления кофермента. Однако, имея дело с предельно чистыми препаратами Г-1-Ф, необходимо для достижения максимальной активности прибавлять чистый Г-1,6-Ф. В дрожжах и мышцах был обнаружен фермент, катализирующий фосфорилирование Г-1-Ф в Г-1,6-Ф

при помощи АТФ (154). Этот фермент был назван глюкозо-1-фосфат-киназой. Г-1,6-Ф может также образоваться в ходе следующей реакции (176):



Число оборотов фермента печени кролика равно 16800. Вся ферментативная активность была найдена в растворимой фракции цитоплазматических белков клетки (89).

ФГМ находится в плазме здорового человека и животных, где можно определить ее активность. Изменения активности ФГМ наблюдаются при злокачественных опухолях, эпидемическом гепатите, злокачественном малокровии, лейкозе с метастазами в костях. Особенно высокая активность ФГМ была обнаружена в одном из случаев отравления окисью углерода (32, 149).

Методы определения активности ФГМ. При определении активности ФГМ используют различия в свойствах эфиров Г-1-Ф и Г-6-Ф. Гидролиз в 1 Н НСl при 100° освобождает в течение 7 минут весь фосфор Г-1-Ф, а Г-6-Ф спустя один час отдает лишь 9%, общего количества фосфора. Г-6-Ф является сложным эфиром, восстанавливающим щелочные растворы меди; Г-1-Ф этим свойством не обладает. Следовательно, пользуясь Г-1-Ф в качестве субстрата, можно определить активность ФГМ, либо измеряя количество кислотолабильного фосфора, либо определяя рост во время инкубации количества восстанавливающего сахара.

Определение активности ФГМ по методу Bodansky (31).

Принцип: определение активности состоит в измерении убыли кислотолабильного фосфора, после инкубации фермента с Г-1-Ф в качестве субстрата.

Ход определения. Отмеривают в центрифужную пробирку 0,5 мл 0,025 М раствора дикалиевой соли Г-1-Ф, доведенной до pH 7,6; затем добавляют 1,0 мл буфера Tris pH 7,4; 0,25 мл 0,2 М раствора гистидина, доведенного до pH 7,6; 0,1 мл 0,03 М раствора Mg^{++} и 0,15 мл $2,5 \times 10^{-5}$ М раствора Г-1,6-Ф. Пробирку ставят в водяную баню с температурой 37° и через 5 минут пускают в ход реакцию, прибавляя 0,5 мл сыворотки, предварительно подогретой до той же температуры. После 4 часов инкубации переносят 1 мл смеси в 5 мл охлажденного 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Перемешивают и фильтруют в пробирки, охлажденные на льду. В частях фильтрата определяют неорганический фосфор и кислотолабильный фосфор, сравнивая с холостой пробой, освобожденной от белка в то же время.

Автор выражает активность фермента в единицах, равных 10^2 числа μ молей Г-6-Ф, образующегося в 1 мл инкубационной смеси, в приведенных условиях. Активность фермента у 19 исследованных лиц в возрасте от 25 до 65 лет составляла в среднем 46 ± 17 единиц. Максимальная активность в этой группе равнялась 84 единицы, минимальная — 17 единиц.

Оптимум pH фермента, по имеющимся данным, равен 7,6. Активность не изменялась в пробе, находившейся 8 часов при комнатной температуре. Однако, после двухдневного хранения в холодильнике, при температуре 5—10°, активность фермента заметно понизилась.

Определение активности ФГМ по методу Noltmann и Bruns (149).

Принцип: в биологическом материале, постоянно содержащем избыток фосфогексоизомеразы, продукт реакции, катализируемой ФГМ, т.е. глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф) подвергается частичной изомеризации в фруктозо-6-фосфат (Ф-6-Ф). Следовательно, можно определить активность ФГМ, измеряя прирост Ф-6-Ф по колориметрическим методом Roe (168).

Ход определения: 1,0 коллидинового буфера (0,1 М, pH 6,9—7,0); 0,25 мл MgSO_4 (0,25 М); 0,25 мл раствора цистеина (0,25 М, pH 7,0); 0,5 мл раствора глюкозо-1-фосфата (0,05 М) отмеривают в центрифужную пробирку и ставят в водяную баню при темпера-

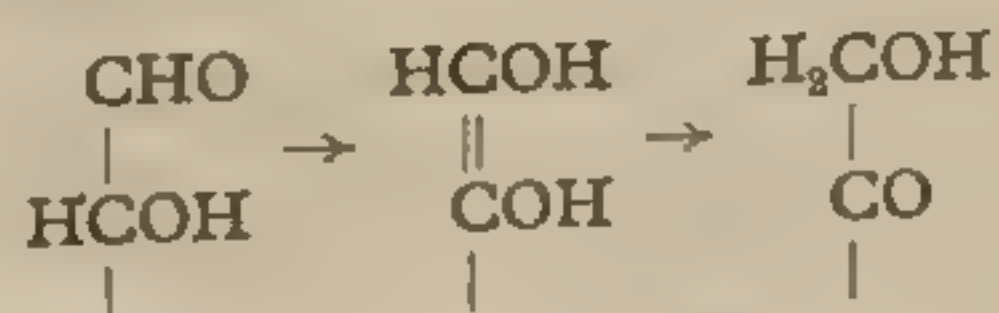
За меру активности авторы принимают число μ молей гексозо-6-фосфатов, образующихся из Г-1-Ф под влиянием 1 мл сыворотки в продолжение часа. Это число равняется полученному количеству Ф-6-Ф, умноженному на 2,5, так как авторами доказано, что частное гексозо-6-фосфатов в любой момент реакции равно 2,5 вследствие присутствия в инкубационной смеси фосfogексонизомеразы. Количество Ф-6-Ф находят по стандартной кривой, составляемой при помощи чистого Ф-6-Ф или, за неимением этого реактива, чистой фруктозы. Ф-6-Ф дает при пользовании методом с фруктозой по Roe (168) только 60,5% интенсивности окрашивания равновесного количества фруктозы, так что искомое количество образовавшегося Ф-6-Ф получают, умножая найденное по стандартной кривой количество фруктозы на коэффициент 2,39; при этом учитывают разницу молекулярного веса обоих соединений (192).

ГЛЮКОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗА (ФГИ)

$$\Gamma\text{-}6\text{-}\Phi \rightleftharpoons \Phi\text{-}6\text{-}\Phi$$

$$68\% \qquad 32\%$$

Преобразование Г-6-Ф в Ф-6-Ф совершается, вероятно, через эндиольную форму, соответственно реакции



Наличие ФГИ в сыворотке было обнаружено Bodansky (27). Этот фермент находится также в спинномозговой жидкости (150). Рост активности ФГИ в сыворотке наблюдается при эпидемическом гепатите (25, 38), инфаркте миокарда (25, 177), злокачественных новообразованиях (28, 30) и при прогрессирующей мышечной дистрофии (Erb). Незначительное повышение активности отмечено при хроническом гепатите, циррозе печени и механической желтухе. Весьма значительное увеличение активности ФГИ в спинномозговой жидкости было отмечено при туберкулезном менингите (6).

Определение активности ФГII по методу Bodansky (29).

Принцип: определение активности состоит в измерении количества получаемого фруктозо-6-фосфата (Ф-6-Ф) после воздействия фермента на субстрат, которым является глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф).

Реактивы: 0,03 М раствор Г-6-Ф — 782 мг бариевой соли Г-6-Ф с суммарной формулой $C_6H_{11}O_9PBa \cdot 7H_2O$ (151) суспендируют в небольшом количестве дистиллированной воды и растворяют прибавляя по каплям концентрированную HCl. Приливают около 16 мл воды и барий осаждают заранее определенным небольшим избытком сернокислого натрия. Сернокислый барий отделяют центрифугированием. Супернатант переносят в другую посуду и доводят его рН едким натром до 7,4. Объем раствора доводят до 50 мл и проверяют его концентрацию определяя общее количество связанного фосфора.

Таблица для пересчета количества фруктозо-6-фосфата, образующегося при ферментативной реакции, на единицы по Bodansky (29)

мг	единицы	мг	единицы	мг	единицы	мг	единицы
1	1	36	36	71	84	106	161
2	2	37	37	72	86	107	163
3	3	38	38	73	88	108	166
4	4	39	39	74	90	109	170
5	5	40	40	75	92	110	172
6	6	41	41	76	93	111	176
7	7	42	42	77	94	112	179
8	8	43	43	78	97	113	182
9	9	44	44	79	99	114	186
10	10	45	45	80	100	115	190
11	11	46	46	81	101	116	194
12	12	47	47	82	103	117	198
13	13	48	48	83	106	118	202
14	14	49	50	84	107	119	206
15	15	50	51	85	109	120	208
16	16	51	52	86	111	121	212
17	17	52	54	87	113	122	216
18	18	53	55	88	115	123	220
19	19	54	56	89	117	124	224
20	20	55	58	90	120	125	229
21	21	56	60	91	122	126	234
22	22	57	61	92	123	127	240
23	23	58	62	93	126	128	245
24	24	59	64	94	128	129	252
25	25	60	66	95	131	130	257
26	26	61	67	96	133	131	264
27	27	62	69	97	136	132	272
28	28	63	70	98	139	133	278
29	29	64	72	99	141	134	286
30	30	65	74	100	144	135	293
31	31	66	76	101	147	136	300
32	32	67	78	102	149	137	307
33	33	68	80	103	153	138	314
34	34	69	81	104	155	139	324
35	35	70	84	105	158	140	331

Веронало-ацетатный буфер по Michaelis: 9,714 г уксуснокислого натрия ($CH_3 \cdot COONa \cdot 3H_2O$) и 14,714 г вероналнатрия растворяют в мерной колбе и доводят объем раствора дистиллированной водой до 500 мл.
Смесь буфера и субстрата: в мерную колбу емкостью в 500 мл отмеривают 125 мл 0,1 Н HCl, 125 мл веронало-ацетатной смеси и 41,65 мл 0,03 М Г-6-Ф. Объем раствора доводят до 500 мл. Окончательная концентрация Г-6-Ф должна равняться 0,0025 М, а рН раствора должно быть 7,4. Если концентрация раствора ниже, ее доводят до желаемой величины первичным раствором Г-6-Ф.

Ход анализа: 0,5 мл сыворотки смешивают с 2 мл физиологического раствора поваренной соли. В центрифужку отмеривают 2 мл смеси буфера и субстрата и ставят в водяную баню при температуре 37°. Реакция пускается в ход прибавлением 0,5 мл разбавленной сыворотки. Инкубируют 30 минут и прерывают реакцию 2,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют. Холостая проба содержит те же ингредиенты, но сыворотку приливают после добавления трихлоруксусной кислоты. 2 мл отцентрифугированной жидкости отмеривают в пробирку и определяют Ф-6-Ф по методу Roe (168), прибавляя 2 мл 0,1% раствора резорцина в абсолютном этаноле и 6 мл 10 Н НСl. Содержимое пробирки перемешивают и подогревают 15 минут при температуре 80°. Фотометрируют после охлаждения, при 490 мμ, сравнивая с холостыми пробами. Количество образующегося Ф-6-Ф находят по стандартной кривой, составленной по чистому Ф-6-Ф или чистой фруктозе. В последнем случае получаемое количество фруктозы умножают на коэффициент 2,39 (192) (см. стр. 18). При большой активности фермента в пробах весь субстрат может быть израсходован в ходе реакции. В таком случае повторяют опыт с сывороткой, разбавленной в 20 или 40 раз, а результат соответственно умножают на 4 или 8. Автор выражает активность ФГИ в единицах, равных обратной величине количества сыворотки в мл на мл реактивной смеси, обуславливающей образование 25 μг Ф-6-Ф при заданных условиях. Итак, активность 167 единиц для данной сыворотки означает, что 1/167 см⁻¹ или 0,006 мл этой сыворотки вызвало бы образование 25 μг Ф-6-Ф при стандартных условиях. Для удобства при вычислении активности приводится составленная автором таблица, при помощи которой легко пересчитать количество Ф-6-Ф на единицы.

Активность сыворотки не изменяется за 8 часов хранения при комнатной температуре или за 1—2 недели в холодильнике. Активность фермента, обнаруженная автором у 31 здорового лица, равнялась 20 единицам (от 8 до 40 единиц). Активность фермента в легких была в 270 раз выше, чем в сыворотке, а в мозгу, печени, мышцах и костях соответственно в 480, 1120, 1120 и 650 раз выше.

Определение активности ФГИ в спинномозговой жидкости (150). Реактивы те же, что при методе Bodansky.

Ход определения: 1,5 мл забуференного субстрата и 0,5 мл спинномозговой жидкости инкубируют при температуре 37,5° в течение 60 минут. Затем прерывают реакцию, прибавляя 6 мл 30% НСl. Прибавляют 2 мл раствора резорцина, тщательно перемешивают и подогревают 15 минут при температуре 80°. По истечении этого срока пробы охлаждают и фотометрируют аппаратом Пульфриха с фильтром S₅₀ и кюветами толщиной в 2 см. Холостая проба содержит смесь тех же компонентов, но без инкубации. Количество образующегося Ф-6-Ф вычисляют на основании разности экстинкций холостой и исследуемой проб. Активность фермента, выраженная в единицах, равняется числу μг Ф-6-Ф, получаемого при воздействии 0,5 мл жидкости на субстрат в продолжение часа, при вышеуказанных условиях. Активность фермента в биологических жидкостях, в физиологических условиях, равняется до 80 μг Ф-6-Ф.

Весьма низкое количество белка в спинномозговой жидкости облегчает определение, так как нет необходимости осаждать белок перед определением Ф-6-Ф. Прибавление, по окончании инкубации, концентрированной соляной кислоты немедленно приостанавливает ферментативную реакцию. У жидкостей с большой активностью ФГИ, которые при инкубации с субстратом в продолжение 1 часа вызывают образование более чем 100 μг Ф-6-Ф, рекомендуется повторить определение с жидкостью, разбавленной физиологическим раствором поваренной соли, с учетом степени разведения при окончательном вычислении. В случае необходимости, можно также сократить срок инкубации.

Определение активности ФГИ по методу Bruns и Hinsberg (39). Этот метод представляет модификацию описанного способа Bodansky (27, 29).

Реактивы: вероналовый буфер (0,1 М, рН 7,8); 0,06 М раствор натриевой соли Г-6-Ф, рН 7,8 (полученный из бариевой соли); 7% раствор трихлоруксусной кислоты; 0,1% раствор резорцина в абсолютном этаноле; 30% соляная кислота.

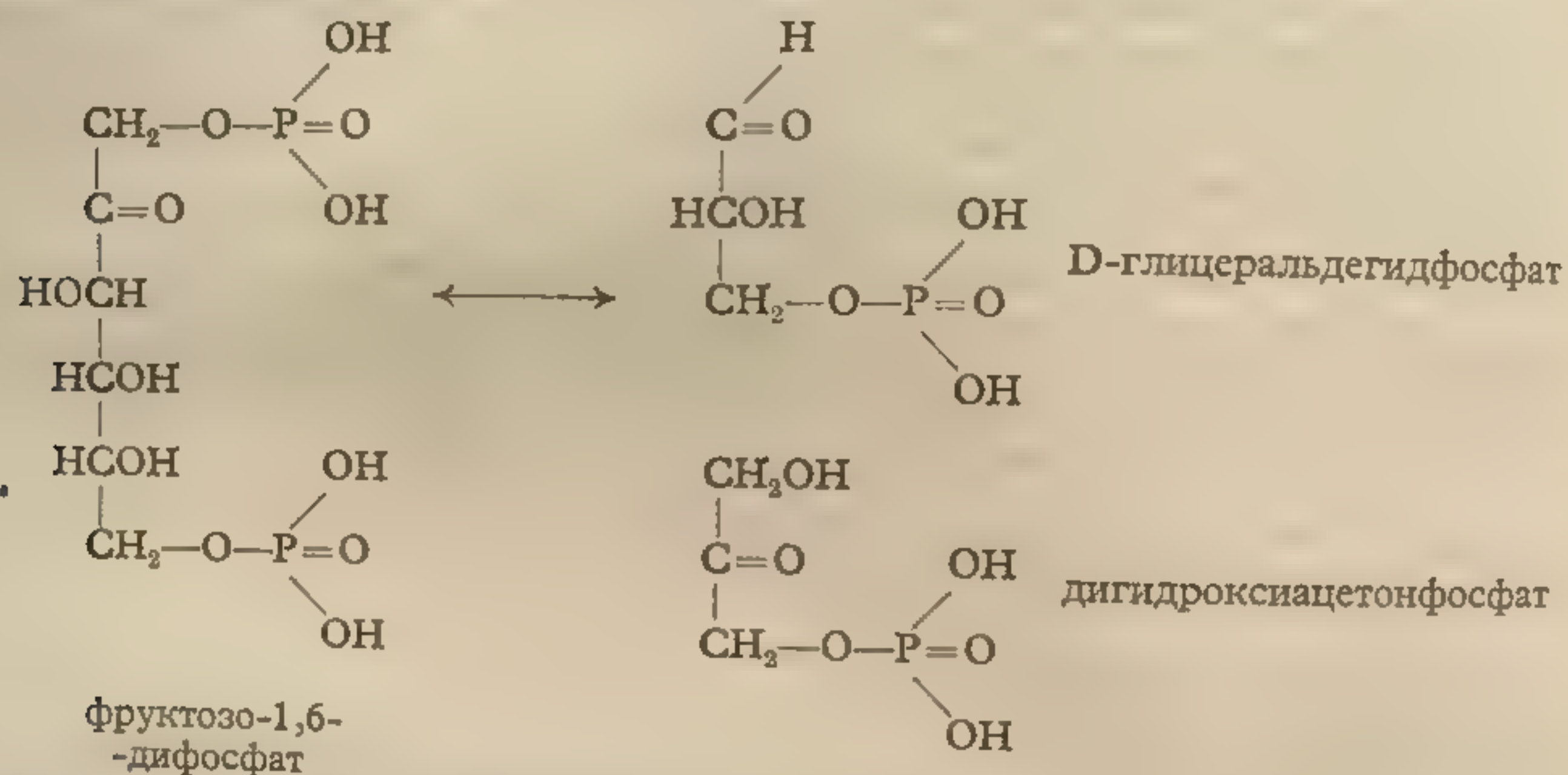
Ход анализа: 1,0 мл сыворотки, 1,0 мл вероналового буфера и 1,0 мл субстрата инкубируют от 30 до 60 минут при температуре 37°. Осаждают белок 7,0 мл трихлоруксусной кислоты и фильтруют. К 2,0 мл фильтрата прибавляют 2,0 мл раствора резорцина и 6,0 мл НСl. Подогревают 8 минут в водяной бане при температуре 80°, охлаждают и фотометрируют при 490 мμ, сравнивая с холостой пробой.

Авторы выражают активность фермента числом мм³ Ф-6-Ф, образующегося при воздействии 1,0 мл сыворотки на субстрат в течение часа, в вышеприведенных условиях. 1 μмоль Ф-6-Ф = 260 μг = 22,4 мм³. Количество Ф-6-Ф находят по стандартной кривой, составленной при помощи чистого Ф-6-Ф или чистой фруктозы по способу, описанному выше (стр. 18).

Активность фермента у здоровых лиц равнялась в среднем 100 мм³ (74—121 мм³). Возраст и пол исследуемых не влиял на результаты определений.

АЛЬДОЛАЗА (АЛД)

Альдолаза является ферментом, катализирующим обратимую реакцию расщепления фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ) на глицеральдегидфосфат и дигидроксиацетонфосфат (127).



Этот фермент широко распространен в животных тканях; особенно большое количество АЛД встречается в мышцах, а также в печени, почках, эритроцитах. Кристаллы миогена А, полученные в 1939 г. из мышцы кролика Bagowski (13), отличаются альдолазной активностью. Warburg и Christian получили АЛД в кристаллическом виде (207) и первыми обнаружили ее присутствие в сыворотке крови крыс.

Наличие дигидроксиацетонфосфата необходимо для действия фермента: глицеральдегидфосфат может быть замещен в реакции синтеза рядом других альдегидов — глицеральдегидом, формальдегидом, ацетальдегидом и др. (128). Конденсация альдегидов из дигидроксиацетонфосфата представляет пример альдольной конденсации; отсюда название фермента — альдолаза. Константа равновесия зависит от температуры. При низких температурах преобладает конденсация, при повышении температуры, наоборот, происходит сдвиг равновесия в сторону образования триоз.

Есть ряд методов определения активности АЛД. Meyerhof и Lohman (127) использовали с этой целью лабильность фосфотриоз в щелочной среде. При комнатной температуре, под влиянием 2Н NaOH, происходит полный распад образующихся во время реакции фосфотриоз на ортофосфат и молочную кислоту; при тех же условиях ФДФ не изменяется. Спектрофотометрический метод определения активности АЛД был впервые применен Warburg. Этот метод состоял в измерении роста экстинкции при 340 мμ, в связи с восстановлением НАД в системе, содержащей ФДФ, НАД, избыток глицеральдегиддегидрогеназы и мышьяковую кислоту.

В клинических лабораториях наиболее распространен метод колориметрического определения АЛД по Sibley и Lehninger (174). Он состоит в колори-

метрическом измерении количества фосфотриоз, образующихся в ходе реакции, при помощи 2,4-динитрофенилгидразина. Это соединение образует с фосфотриозами гидразоны, колориметрируемые в щелочной среде. Наличие в реакционной среде гидразина, связывающего фосфотриозы и тормозящего фосфотриозо-изомеразу, вызывает сдвиг равновесия ферментативной реакции в сторону расщепления ФДФ, а также обуславливает образование обеих триоз в равном количестве.

Определение активности альдолазы нашло применение при дифференциальной диагностике болезней печени, и особенно при распознавании эпидемического гепатита, в ходе которого активность фермента увеличивается в среднем в 7—20 раз (38, 40). Помимо того, исследование активности альдолазы имеет некоторое значение в диагностике новообразований, особенно рака предстательной железы (12, 175), прогрессирующей мышечной дистрофии (Erb) (93), инфаркте миокарда (177, 198), правожелудочковой недостаточности (152) и других (153, 164).

Определение активности альдолазы (АЛД) по методу Bruns (41).

Принцип: этот метод является модификацией способа Sibley и Lehninger (174), который заключается в колориметрическом определении количества фосфотриоз, образующихся при инкубации фермента с фруктозо-1,6-дифосфатом (ФДФ), с использованием цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином.

Реактивы: 1) 0,06 М раствор натриевой соли ФДФ — ее получают из бариевой соли этого эфира путем осаждения бария сернокислым натрием. Ввиду того, что при этом теряется часть эфира, окончательную концентрацию раствора проверяют определением фруктозы по методу Roe (168), принимая, что 1 моль ФДФ соответствует 0,525 моля фруктозы (174). Концентрацию ФДФ в растворе определяют также анализом фосфора. Гидролиз раствора ФДФ в 1N H₂SO₄ освобождает в течение 10 минут 37% фосфора, а в течение часа 67% фосфора. Раствор доводят до pH 7,4 и хранят в холодильнике с несколькими каплями толуола. Годность раствора 2—3 недели.

2) 0,56 М раствор гидразина — сульфат гидразина доводят до pH 7,4 при помощи NaOH,

3) 0,002 М раствор йодацетата, pH 7,4,

4) раствор 2,4-динитрофенилгидразина — 250 мг вещества растворяют в 250 мл 2N HCl,

5) 10% трихлоруксусная кислота,

6) 0,75 N раствор NaOH,

7) 0,1 М коллидиновый буфер (2,4,6-триметилпиридин) pH 7,4.

Растворы гидразина, йодацетата и коллидиновый буфер можно смешивать в следующих пропорциях: 100 частей коллидинового буфера, 25 частей гидразина, 25 частей йодацетата и 25 частей дистиллированной воды, а затем употреблять как один реактив. Однако, наш личный опыт указывает на то, что можно определять активность фермента в сыворотке и без йодацетата.

Ход определения: инкубируют в водяной бане, при температуре 37°, в течение 60 минут, 1,75 мл смеси растворов коллидина, гидразина и йодацетата, 0,25 мл ФДФ и 1 мл сыворотки. Реакцию останавливают 3,0 мл трихлоруксусной кислоты. Смесь фильтруют или центрифугируют. К 1,0 мл фильтрата прибавляют 1,0 мл 0,75 N NaOH и ставят на 10 минут. В щелочной среде происходит отщепление фосфора от фосфотриоз, а свободные триозы дают более стойкое окрашивание, чем их эфиры. Затем добавляют 1,0 мл 2,4-динитрофенилгидразина и подогревают в водяной бане, при температуре 37°, в течение 10 минут. Доводят пробы 0,75 N NaOH до объема 10 мл и колориметрируют при 540 мμ (S₅₃), сравнивая с холостой пробой, которая подвергается той же процедуре, но ФДФ прибавляют после осаждения белка. Фотометрируют не раньше 3 и не позже 15 минут после появления окрашивания, так как в это время окрашивание наиболее интенсивно и постоянно.

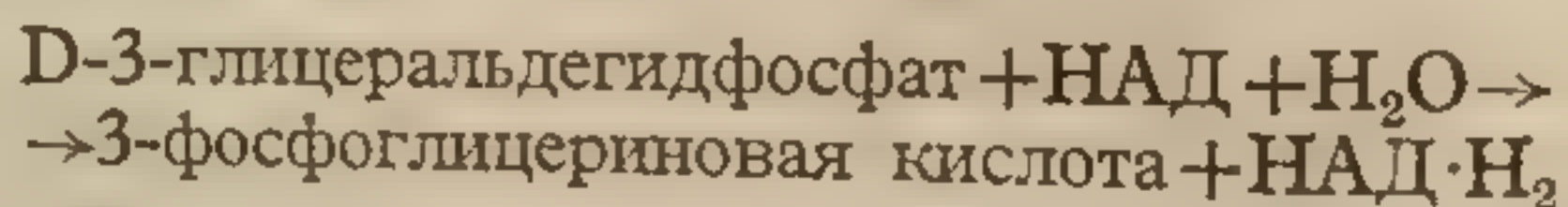
За неимением химически чистых фосфотриоз метод стандартизируют используя щелочелабильный фосфор из фосфотриоз, образующийся в ходе ферментативной реакции. В 1 мл трихлоруксусного фильтрата определяют количество щелочелабильного фосфора. Если на координаты нанести число μг фосфора в 1 мл трихлоруксусного фильтрата против реакций экстинкции для одного и того же количества раствора, после проведения цветной реакции на триозы, получается кривая, по которой можно вычислить активность в исследуемой пробе, учитывая при этом следующую зависимость:

1 μмоль ФДФ = 22,4 мм³ = 2 μмоля фосфотриоз = 2 μмоля щелочелабильного фосфора = 62 μг щелочелабильного фосфора.

Активность выражается авторами в мм³ ФДФ, расщепленного 1 мл сыворотки в течение часа, в данных условиях. Активность сыворотки у здоровых лиц составляет в среднем 5,4 мм³ ФДФ (3,0—8,0). Эритроциты содержат на много больше фермента, чем сыворотка; поэтому гемолизованная сыворотка непригодна для анализа. При указанных условиях активность фермента пропорциональна количеству сыворотки и продолжительности инкубации. В вероналовом буфере активность несколько меньше, чем в коллидиновом. Фосфатный и боратный буфера тормозят фермент. У большинства животных активность альдолазы в сыворотке выше, чем у человека. Так у крысы активность альдолазы в сыворотке в 8 раз, а у кролика и мыши соответственно в 10 и 20 раз выше, чем у человека.

Беск (16) рекомендует чистый глицеральдегид в качестве стандарта при определении активности альдолазы. Продление времени подогрева динитрофенилгидразонов до 60 минут уравнивает экстинкции обеих триоз, являющихся продуктами реакции. Готовят раствор глицеральдегида, содержащий 50 мг вещества в 10 мл Н₂О и оставляют его на 2—4 дня при комнатной температуре для деполимеризации. 1 мл этого раствора, разбавленный в отношении 1 : 25 дает раствор, содержащий 2,22 μмоля/мл. Пробы этого раствора подвергают полной процедуре определения активности АДД.

Можно также определять активность АДД двумя спектрофотометрическими способами. В методе Warburg и Christian (208) пользуются инкубационной смесью из ФДФ, НАД, арсената (N₂HASO₄ · 7H₂O) и кристаллической D-3-глицерол-фосфат-дегидрогеназы в избытке. Образующийся в ходе ферментативной реакции D-3-глицерофосфат окисляется в 3-фосфоглицериновую кислоту по следующей схеме:



Прирост экстинкции при 340 мμ является мерой активности фермента. Определение активности альдолазы по этому методу может быть связано со значительной ошибкой, если в среде имеются ферменты, препятствующие реакции (14). Образующийся в ходе реакции НАД · Н₂ может быть использован для восстановления находящихся в данной среде соединений, например винной кислоты.

При втором методе инкубационная смесь содержит ФДФ, монойодуксую кислоту, НАД · Н₂, фосфотриозоизомеразу в избытке и фермент Вагановски (15, 17). Между обеими фосфотриозами образующимися в ходе альдолазной реакции, благодаря присутствию фосфотриозоизомеразы, устанавливается состояние равновесия, при котором дигидроксиацетонфосфат составляет около 96%. Последний, под влиянием фермента Вагановски и восстановления никотинамидадениндинуклеотида, полностью восстанавливается в α-глицерофосфат. Следовательно, уменьшение экстинкции при 340 мμ является мерой активности альдолазы. Присутствующая в данной среде монойодуксая кислота тормозит D-3-глицеральдегидфосфат-дегидрогеназу, а тем самым и обратную реакцию восстановления образующегося НАД.

АЛЬДОЛАЗА ФРУКТОЗО-1-ФОСФАТА

Этот фермент встречается в печени и почках. В мышцах его нет. Он катализирует обратимую реакцию расщепления фруктозо-1-фосфата (Ф-1-Ф) на дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид (106).

В сыворотке здоровых лиц этот фермент отсутствует. Он появляется при поражении печени (эпидемический гепатит). Однако при механической жел-

тухе и
в сыво
при ци

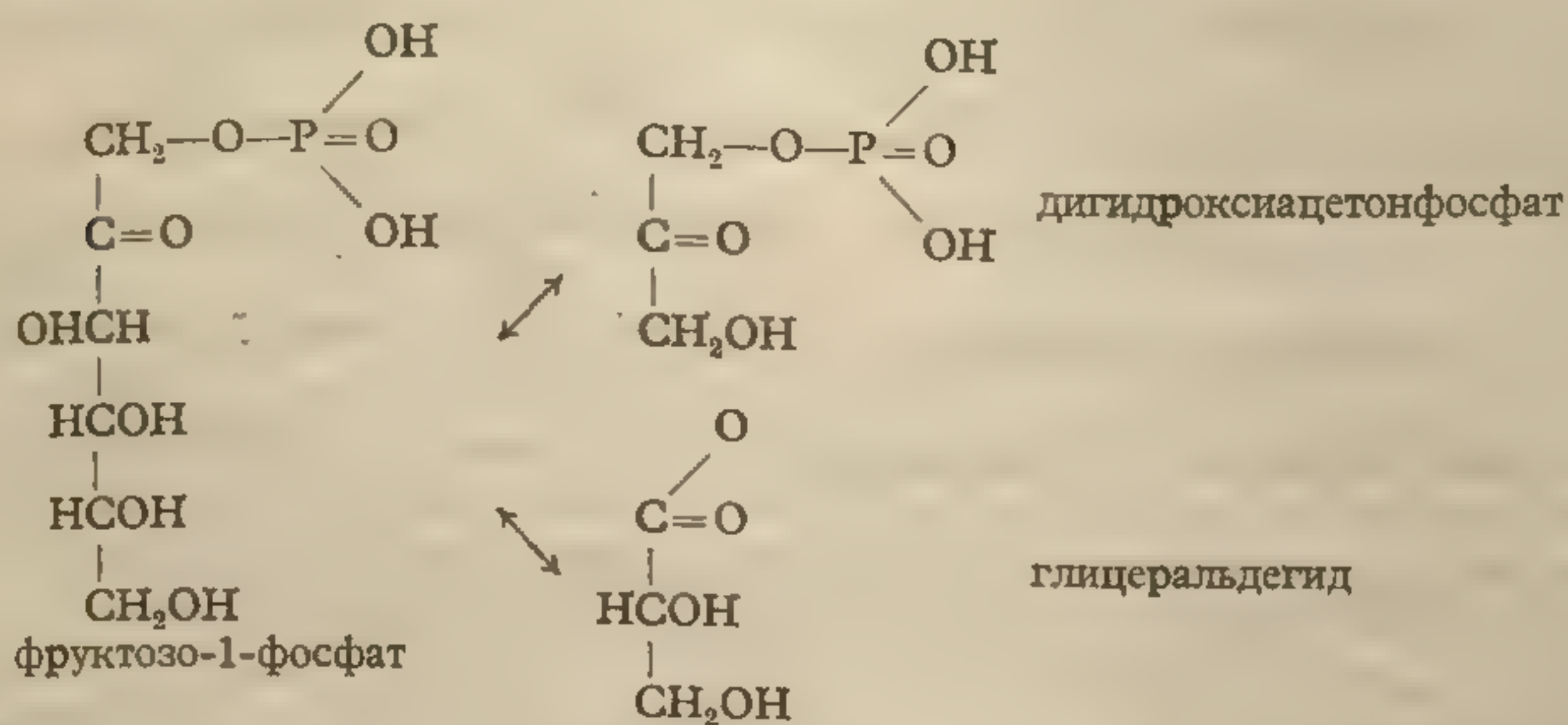
Появл
более ве
ности об
многих
Актив
по котор
вместо
активнос
Ваганов
дукта ал
ние экст
Опред
Реакт
1) НА
2) раст
в 8 мл
10 мл.
3) сус

Ход оп
к нолу эк
так, чтобы
температур
минут и оп
сыворотки
словлено н
ротке. При
этого проц

Этот ф
участии Н
ческих ф
с перево
фора. Пр
(206, 143)

11 — Клини

тухе и неоплазматических метастазах в печени ферментативная активность в сыворотке также отсутствует. Иногда встречается небольшая активность при циррозе печени.



Появление фермента в сыворотке представляет, по всей вероятности, более верный признак поражения печени, чем результаты определения активности обыкновенной альдолазы, которая в силу своего распространения во многих тканях изменяется при многих других заболеваниях.

Активность АД-Ф-1-Ф можно определять по методу Sibley и Lehninger по которому определяют активность обыкновенной альдолазы (174), причем вместо ФДФ берут Ф-1-Ф. Wolf и сотр. (216) применили для определения активности фермента спектрофотометрический метод. Прибавление фермента Baranowski и НАД·Н₂ к реакционной среде вызывает восстановление продукта альдолазной реакции дигидроксиацетона в α-глицерофосфат. Уменьшение экстинкции при 340 мμ является мерой активности фермента.

Определение активности АД-Ф-1-Ф в сыворотке (216).

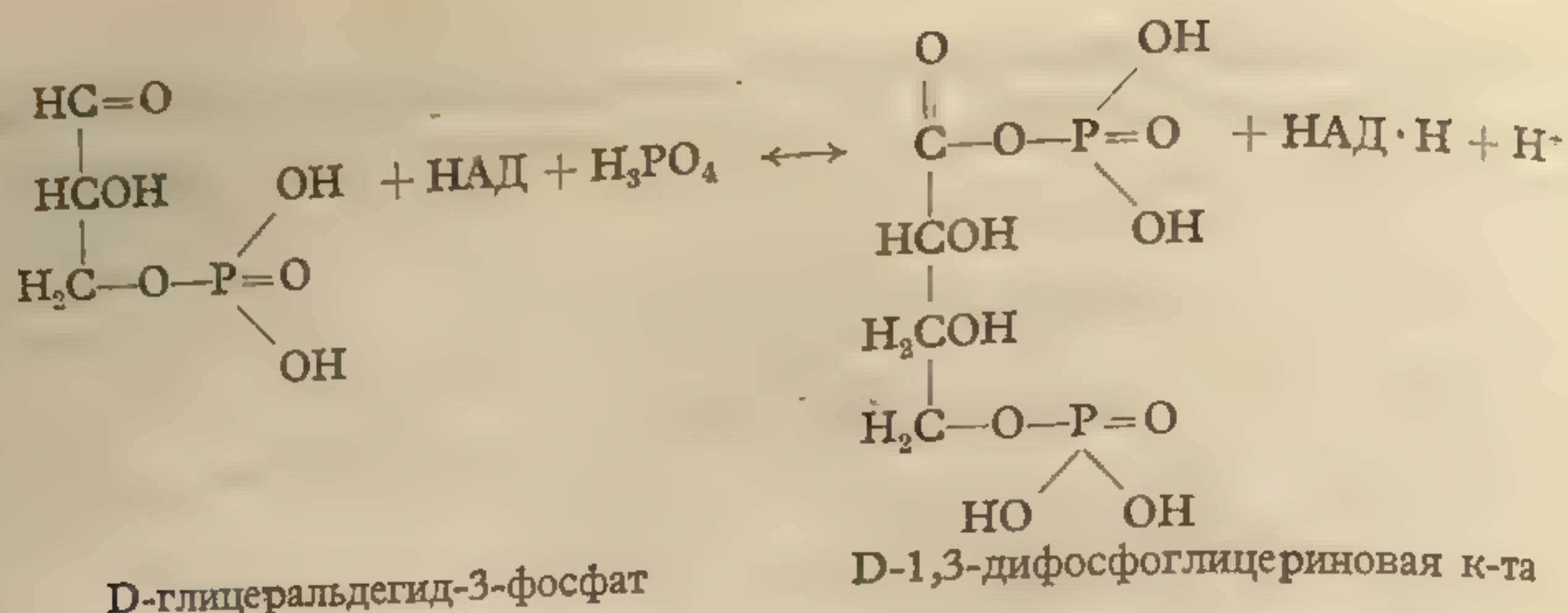
Реактивы:

- 1) НАД·Н₂: 100 мг вещества растворяют в 10 мл NaHCO₃, pH 7,6.
- 2) раствор Ф-1-Ф: 1,8 г бариевой соли Ф-1-Ф (Boehringer) растворяют в 8 мл воды, барий осаждают сернокислым натрием и доводят объем до 10 мл.
- 3) суспензия кристаллической α-глицерофосфат-дегидрогеназы.

Ход определения: отмеривают в кювету спектрофотометра 1,8 мл сыворотки и сводят к нулю экстинкцию прибора для этой пробы. Прибавляют 0,05 мл раствора НАД·Н₂, так, чтобы экстинкция повысилась приблизительно до 1,2. Инкубируют 15—20 минут при температуре 25°. Прибавляют 40 μг фермента Baranowski и 0,2 мл Ф-1-Ф. Ждут еще 5 минут и определяют время, необходимое для изменения экстинкции на 0,1. Для нормальной сыворотки это время не короче 60 минут. В этих условиях E изменяется на 0,1, что обусловлено наличием остатков пирувата и других восстанавливающихся соединений в сыворотке. При наличии АД-Ф-1-Ф, т.е. при поражении печени, время, необходимое для этого процесса, значительно сокращается.

ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИДФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗА (ГАФД)

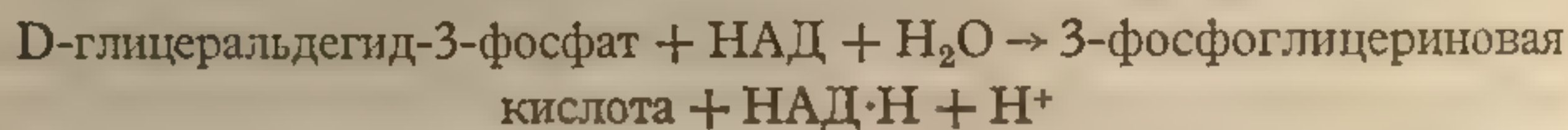
Этот фермент катализирует окисление D-глицеральдегид-3-фосфата, при участии НАД в качестве кофермента. Необходимо также наличие неорганических фосфатов, в присутствии которых окисление альдегида сопряжено с переводом неорганических фосфатов в органические соединения фосфора. Продуктом реакции является D-1,3-дифосфоглицериновая кислота (206, 143).



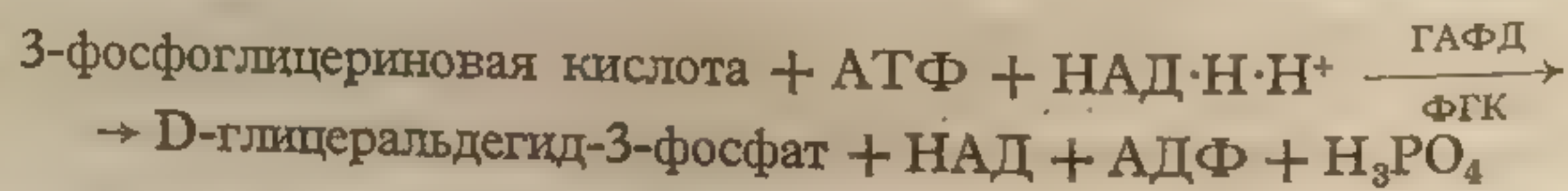
Новообразующаяся фосфорная связь имеет характер ангидрида и отличается высокой энергетичностью. Затем фосфатный остаток этой кислоты переносится посредством фосфоглицеринаткиназы на АДФ и образует АТФ.

Фермент был изолирован в кристаллической форме из мышцы кролика (56) и содержит стойко связанный НАД. В этой связи вероятно участвуют группы SH. Йодацетат и парахлорбензоат ртути сильно тормозят фермент.

Определение активности ГАФД состоит в измерении роста экстинкции при 340 мμ в системе, содержащей D-глицеральдегид-3-фосфат, НАД и арсенат, по методу, предложенному Warburg (203). Реакция проходит в соответствии со схемой:



По мнению Bücher, эта реакция непригодна для определения активности фермента в сырых вытяжках, так как НАД·Н₂ входит во вторичные реакции благодаря наличию в данной среде триозофосфатизомеразы и фермента Вагпowski. Активность фермента определяют также спектрофотметрическим методом по 3-фосфоглицериновой кислоте в системе, содержащей НАД·Н₂, АТФ и фосфоглицеринаткиназу в избытке (ФГК). Реакция идет по схеме:

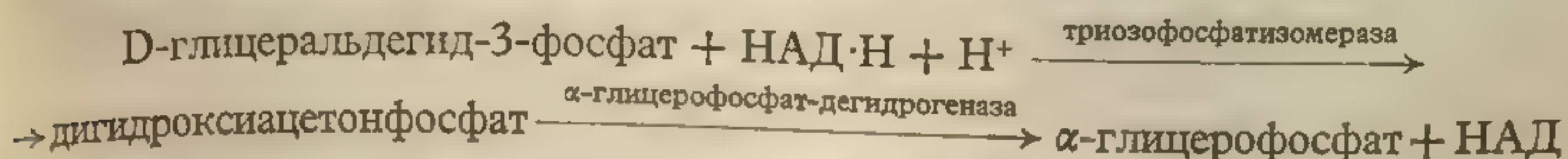


Скорость уменьшения экстинкции при 340 мμ в этой системе является мерой активности фермента. Фермент находится в сыворотке (170, 122). У здоровых лиц активность его равняется 0,24 единицы Bücher в 1 мл сыворотки (0,01—0,44). Диагностическое значение фермента на сегодняшний день мало разработано. Рост активности был обнаружен при эпидемическом гепатите.

ТРИОЗОФОСФАТИЗОМЕРАЗА

Этот фермент катализирует обратимую реакцию равновесия между D-глицеральдегид-3-фосфатом и дигидроксиацетонфосфатом (129), т.е. триозами, образование которых связано с влиянием альдолазы на фруктозо-1,6-дифосфат. Равновесие реакции сильно смещено в сторону образования дигидроксиацетона ($K_{\text{eq}} = 22$), так что это соединение долгое время считалось единственным продуктом действия альдолазы. При исследовании смеси обоих сложных эфиров пользовались реакцией окисления глицеральдегидфосфата йодом в фосфоглицериновую кислоту. При этом только остающийся дигидроксиацетонфосфат содержит щелочелабильный фосфор. Фосфоглицериновую кислоту можно также определить количественно, используя ее высокую удельную вращательную способность в растворе молибдата (130).

При помощи спектрофотометрии можно определить активность фермента, применяя D-глицеральдегид-3-фосфат в качестве субстрата и прибавляя α -глицерофосфат-дегидрогеназу в избытке. Схема реакции:

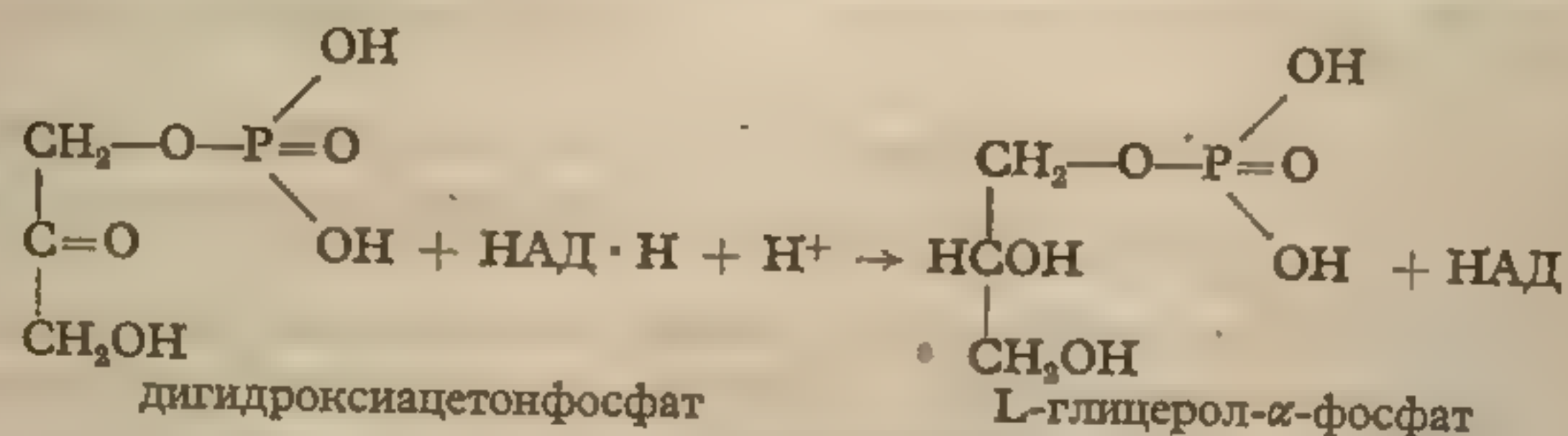


Скорость понижения экстинкции при 340 м μ является мерой активности фермента.

Триозофосфатизомераза находится в сыворотке (122, 126). Ее активность повышается при эпидемическом гепатите. Диагностическое значение этого фермента для других патологических состояний пока еще не изучено.

α -ФОСФОГЛИЦЕРОЛ-ДЕГИДРОГЕНАЗА, ФЕРМЕНТ BARANOWSKI, ГЛИЦЕРОФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗА (ГДГ)

Этот фермент катализирует при участии НАД \cdot Н $_2$ обратимую реакцию восстановления дигидроксиацетонфосфата в L-глицерол- α -фосфат. Фермент был изолирован в кристаллической форме из мышцы кролика Baranowski (15).



При нейтральном рН, константа равновесия реакции составляет около 10^4 ; это значит, что реакция практически проходит полностью вправо, в сторону восстановления дигидроксиацетонфосфата в глицерол- α -фосфат. При рН около 10 и с помощью веществ, окисляющих НАД \cdot Н $_2$ или связывающих образующийся дигидроксиацетон (гидразин) можно добиться окисления L-глицерол- α -фосфата и восстановления НАД.

Есть еще один фермент, окисляющий L-глицерол- α -фосфат без участия НАД, связанный с митохондриями клетки и цитохромной системой (82).

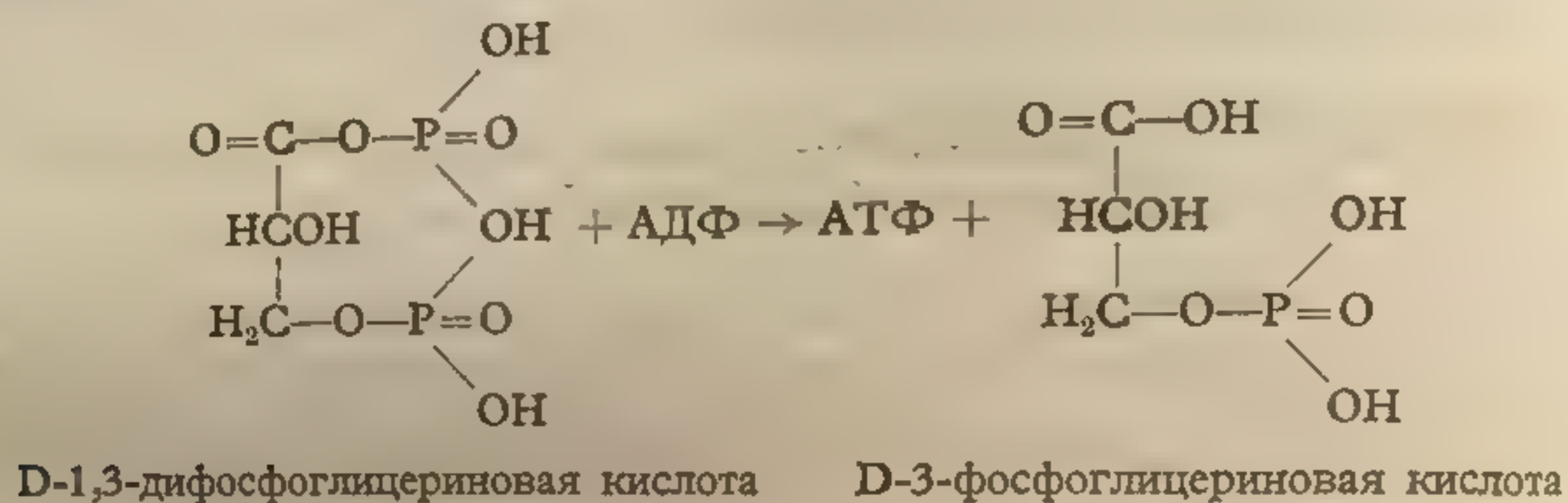
Активность ГДГ определяется спектрофотометрически по Baranowski (15), путем вычисления понижения экстинкции при 340 м μ в ходе реакции, представленной в вышеприведенной схеме. Фермент ГДГ находится в сыворотке (122, 170). У здоровых лиц его активность равна в среднем 0,12 единицы Bücher в 1 мл сыворотки (0,05—0,21). Amelung и сотр. (5a) рекомендуют следующий состав инкубационной смеси для определения активности фермента в сыворотке: 2,6 мл буфера Tris (0,1 М, рН 7,4), 0,1 мл НАД \cdot Н $_2$ (80 мг 63% препарата в 10 мл дистиллированной воды), 0,2 мл сыворотки в разведении 1:5. Реакцию пускают в ход прибавлением дигидроксиацетонфосфата (Boehringer) в концентрации около 0,005 М.

Glogner (80) определял активность фермента в сыворотке при помощи следующей системы: 1,0 мл триэтаноламинового буфера М/20 рН 7,4, 1,0 сыворотки, 0,05 мл смеси дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегидфосфата, 0,1 мл НАД \cdot Н $_2$ (6 мг/мл). Объем смеси доводят водой до 3 мл. Толщина измерительной кюветы 1 см, температура 25°, отсчет производят при 366 м μ . Буфер, сыворотку и НАД \cdot Н $_2$ инкубируют с водой в кювете при температуре 25°, при этом проходят неспецифические реакции с расходом НАД \cdot Н $_2$. Затем вводят субстрат и отсчитывают изменения Е каждые 60 секунд. Для вычисления активности пользуются отсчетами между третьей и седьмой минутами. Автор выражает активность в молях субстрата на мл сыворотки и час, при температуре 25°.

У здоровых лиц активность фермента невелика. В среднем она составляет 0,07 единицы. Увеличение активности было обнаружено при остром гепатите; она практически не меняется при хроническом гепатите и циррозе печени (170). Не обнаружено роста активности при инфаркте миокарда, хронических лейкозах и злокачественных новообразованиях (80).

ФОСФОГЛИЦЕРАТКИНАЗА

Этот фермент переносит фосфор с 1,3-дифосфоглицериновой кислоты на АДФ с образованием АТФ и D-3-фосфоглицериновой кислоты.

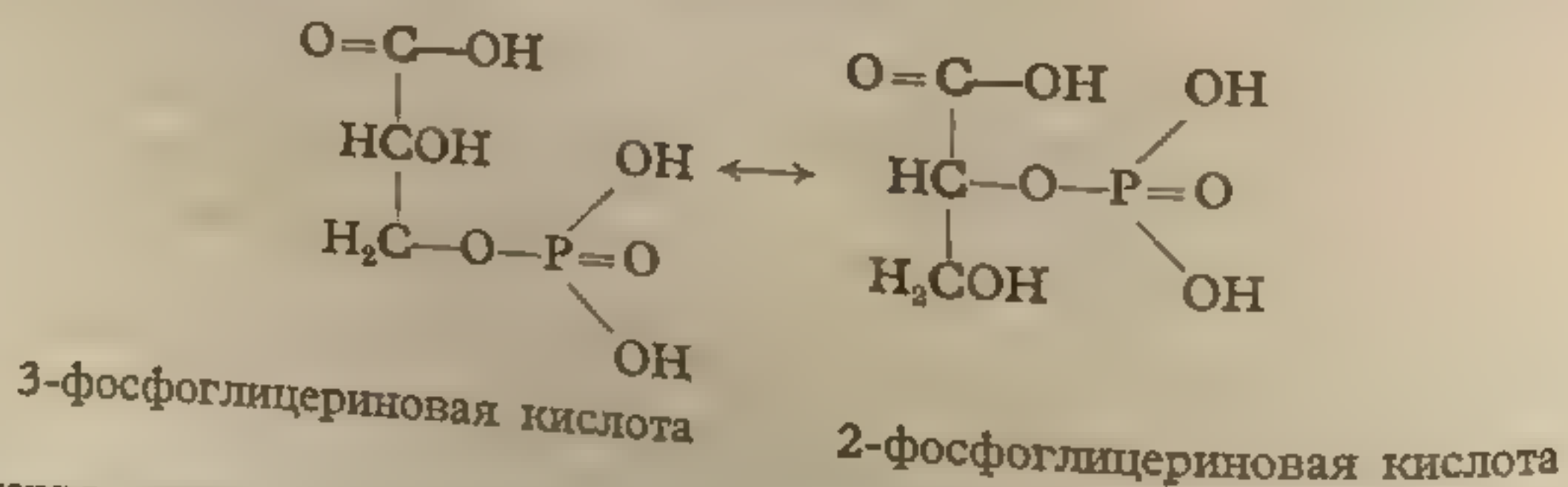


В кристаллической форме фермент был получен Bücher и сотр. (45) из дрожжей. Подобно другим киназам, и этот фермент нуждается в ионах Mg^{++} в качестве активатора.

Активность фермента можно определить спектрофотометрически путем измерения восстановления НАД в системе, содержащей D-3-глицеральдегидфосфат, неорганические фосфаты, АДФ, НАД и глицеральдегидфосфатдегидрогеназу в избытке. Можно также измерять активность фосфоглицераткиназы в ходе обратной реакции, исходя из D-3-фосфоглицериновой кислоты в качестве субстрата. В сыворотке здоровых лиц активность фосфоглицераткиназы весьма невелика или полностью отсутствует (122).

ФОСФОГЛИЦЕРОМУТАЗА (ФГМ)

Этот фермент катализирует обратимое превращение 3-фосфоглицериновой кислоты в 2-фосфоглицериновую кислоту.

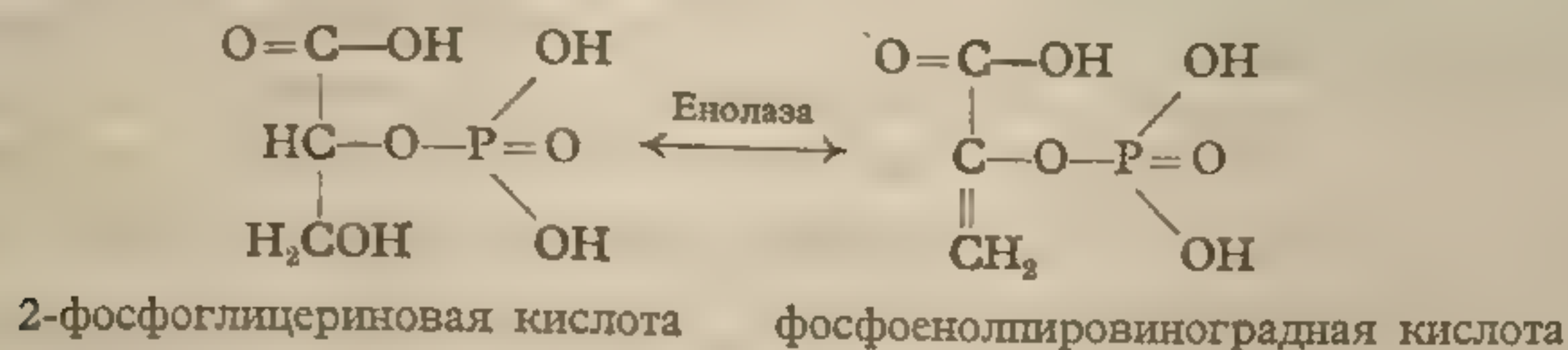


Эти эфиры отличаются друг от друга вращательной способностью поляризованного света в растворе молибдата (130). Аналогично фосфогликомутазе, и в этой реакции имеется кофермент — 2,3-дифосфоглицериновая кислота (186). При измерении активности фермента используют изменение вращательной способности по мере перехода 2-фосфоглицериновой кислоты в 3-фосфоглицериновую кислоту (187). Активность фермента определяют также спектрофотометрически, используя 3-фосфоглицериновую кислоту и прибавляя ферменты, доводящие реакцию до молочной кислоты. В сыворотке

здоровых лиц ферментативная активность мала или полностью отсутствует (122). Изменения активности фермента при разных патологических состояниях еще недостаточно выявлены.

ФОСФОПИРУВАТ-ГИДРАТАЗА (ЕНОЛАЗА)

Этот фермент катализирует обратимое превращение 2-фосфоглицериновой кислоты в фосфоенолпировиноградную кислоту, причем отщепляется молекула воды (111, 131, 132).



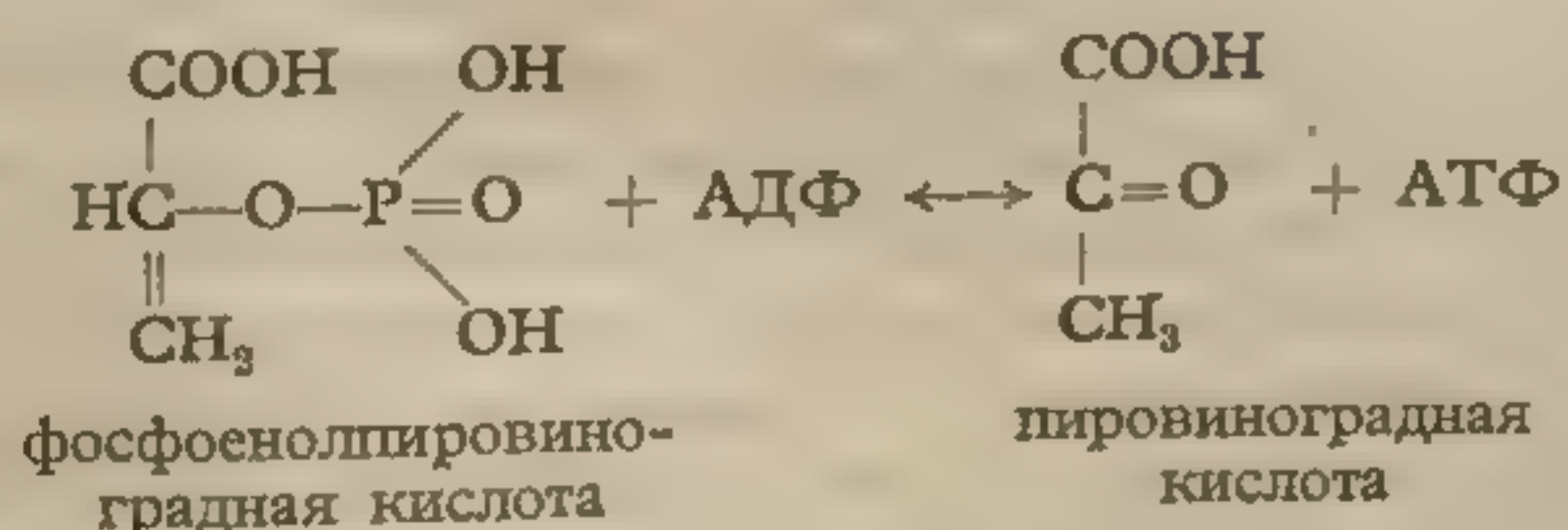
Для превращения фермента в активную форму необходимо участие ионов Mg^{++} , Mn^{++} или Zn^{++} . Торможение гликолиза фторидами происходит путем подавления активности енолазы. Механизм тормозящего влияния фторидов на фермент выяснен Warburg и Christian как образование комплекса Mg-F-PO_4 . Те же авторы получили фермент в форме кристаллической соли ртути. Осаждение ртути в виде сульфида полностью восстанавливает активность фермента (205).

Определение активности енолазы производится по методу Warburg и Christian (204). Он основан на том, что фосфоенолпировиноградная кислота сильно поглощает свет при 240 мμ, а 2-фосфоглицериновая кислота практически не поглощает света при этой длине волны (46). У неочищенных препаратов фермента активность енолазы определяют спектрофотометрически при 340 мμ, исходя из 2-фосфоглицериновой кислоты и прибавляя ферменты, доводящие продукты реакции до молочной кислоты.

Енолаза находится в сыворотке человека; ее физиологическая активность равняется приблизительно 0,17 единицы Bücher в мл (0,01—0,33). Активность фермента повышается при эпидемическом гепатите (170).

ПИРУВАТКИНАЗА (ПК)

Этот фермент катализирует перенос фосфатного остатка с фосфоенолпировиноградной кислоты на АДФ с образованием АТФ и пировиноградной кислоты, согласно уравнению:



Равновесие реакции смещено в сторону образования АТФ. Необходимым условием активности фермента, изолированного из мышцы, является присутствие наряду с ионами K^+ , ионов Mg^{++} (156). Молекулярная масса ПК мышцы кролика составляет 230000, оптимальный pH 8,5. АТФ тормозит фермент (139, 140).

Активность фермента в сыворотке определяют спектрофотометрически путем сопряжения реакции с лактатдегидрогеназой и восстановленным ни-

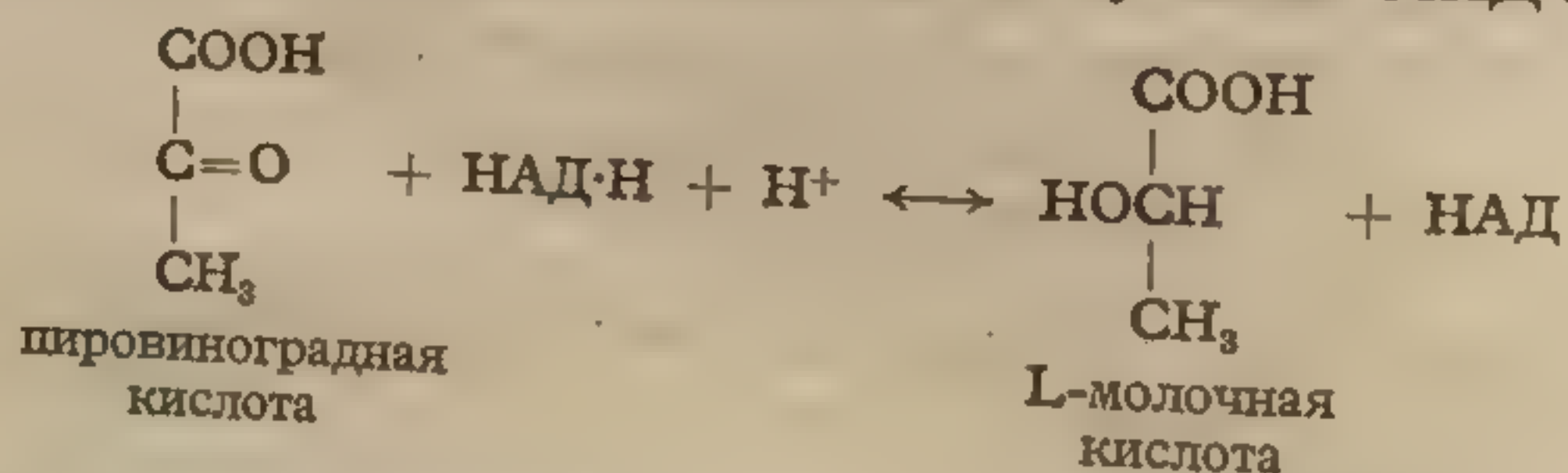
котионамидадениндинуклеотидом (НАД·Н₂). Образующаяся в ходе реакции пировиноградная кислота восстанавливается в присутствии НАД·Н₂ в молочную кислоту. Скорость уменьшения Е при 340 мμ является мерой активности фермента. Фермент находится в человеческой сыворотке (170, 122, 195).

Schmidt и сотр. (170) нашли у 7 здоровых лиц среднюю активность равной 0,58 единицы Bücher в 1 мл сыворотки (0,21—0,89). Van Rymenant и сотр. (195) применили для определения активности фермента в сыворотке инкубационную смесь, рекомендуемую Bücher и сотр. для определения ПК в тканях (47). Она содержит $1,4 \times 10^{-4}$ М НАД·Н₂, $2,3 \times 10^{-4}$ М АДФ, $7,8 \times 10^{-4}$ М фосфоенолпировиноградной кислоты, $8,0 \times 10^{-3}$ М сернокислого магния, $7,5 \times 10^{-3}$ М KCl, 0,035 г лактатдегидрогеназы на литр, триэтаноламиновый буфер — HCl M/20, pH 7,5. Реакцию пускают в ход введением 0,5 мл сыворотки.

Сыворотка не теряет активности в течение 4 часов при комнатной температуре. За 24 часа хранения сыворотки в холодильнике ее активность понижалась на 40%. Возможно, что сыворотка содержит ингибиторы ПК, так как прибавление к сыворотке мышечного фермента уменьшает активность последнего. В связи с постоянным наличием в сыворотке пировиноградной кислоты, после введения сыворотки для пуска ферментативной реакции ждут 5—7 минут прежде, чем приступить к отсчитыванию результатов. Авторы обнаружили у 20 здоровых лиц среднюю активность 62,3 единицы по Wróblewski (32,8—103). В отличие от остальных гликолитических ферментов, активность ПК уменьшалась у 60% больных эпидемическим гепатитом (170). Не было также существенной разницы между активностью фермента у здоровых по сравнению с активностью у 53 больных новообразованиями (195).

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА (ЛДГ)

Этот фермент катализирует обратимую реакцию восстановления пировиноградной кислоты в молочную кислоту при участии НАД·Н₂:



Фермент в кристаллической форме был получен из мышцы сердца. Подобным же образом были получены кристаллические ферментные препараты из скелетных мышц и печени. При pH 7,0 равновесие реакции смещено в сторону образования лактата, в щелочной среде реакция проходит в обратном направлении. ЛДГ может также реагировать с НАДФ в качестве кофермента, но значительно медленнее, чем с НАД.

Во время реакции с парахлор-бензоатом ртути происходит медленная инаktivация фермента. Максимальная активность ЛДГ наблюдается в почках, затем в мышце сердца, скелетных мышцах, поджелудочной железе, селезенке и легких (102). ЛДГ была также изолирована из человеческого миокарда. Ее молекулярная масса равна 140000 (147). Число оборотов фермента сердца равно 78000 молей/мин⁻¹. Относительные скорости восстановления НАД и аналогов: пиридин-3-альдегид-НАД и 3-ацетил-пиридин-НАД составляют для ЛДГ миокарда 100:60:3.

ЛДГ оказалась неомогенным ферментом. Уже Neilands (144, 145) обнаружил в сердечной мышце две электрофоретически отличные фракции с активностью ЛДГ. В сыворотке было найдено несколько белков, обладающих каталитическими свойствами этого фермента. Vesell и Bearn (196) показали, что при электрофорезе белков сыворотки здоровых лиц 48% активности ЛДГ сыворотки движутся с фракцией α_2 -глобулинов, 33% активности — между α_1 -глобулинами и альбуминами, а 19% активности были обнаружены во фракции β -глобулинов. Кроме того, были найдены еще две небольшие фракции с активностью ЛДГ, движущиеся с γ -глобулинами. Итак в общем было обнаружено в сыворотке 5 разделимых пиков активности ЛДГ, причем американские авторы нумеруют их по очереди от 1 до 5, от самой медленной до самой быстрой фракции (197).

Электрофоретическое разделение ЛДГ в экстрактах из человеческих тканей в % к общей активности, по Vesell и Bearn (197)

Ткань	Число исследований	Пик 1	Пик 2	Пик 3	Пик 4	Пик 5
Сердце	8			3±2,5	24±4,7	73±5,6
Почки	8		2±2,9	11±8,1	45±5,2	42±6,9
Печень	8	37±9,6	24±11,9	27±7,2	8±8,9	4±6,6
Скелетные мышцы	4	78±8,9	17±8,6	5±4,2		
Гемолизат			1±1,8	12±2,9	44±4,3	43±2,2
Лейкоциты			6±3,6	33±6,1	49±5,1	12±3,6

Систематическую работу по вопросу дифференцирования ЛДГ провели Wieland, Pfeleiderer и сотр. Они показали, что разные органы одного и того же животного содержат по несколько белков с активностью ЛДГ (212). Кристаллические препараты ЛДГ, полученные из одних и тех же органов разных животных различны между собой; то же касается ЛДГ, полученных из разных органов одного и того же животного (159). Следовательно, существует не только видовая специфичность данного фермента, но и специфичность по органам. Отдельные ферменты отличались друг от друга не только подвижностью при электрофорезе, но и степенью тормозимости сульфитными ионами, оптимумом насыщения фермента субстратом, а также оптимумом pH. Сульфитные ионы сильнее тормозили белки с более низкой изоэлектрической точкой, иначе говоря, быстродвижущиеся фракции (213, 214).

Согласно приведенной таблице, большая часть активности ЛДГ накапливается в мышце сердца и в почке в пределах пиков 5 и 4, т.е. она принадлежит к быстродвижущимся фракциям. Подобными свойствами обладает ЛДГ, изолированная из мозга (160). В скелетной мышце большая часть активности находится в первой, т.е. в самой медленной фракции; также дело обстоит и с печенью. Гладкие мышцы, яички, хрящ, легкие, селезенка, вилочковая железа, предстательная железа и щитовидная железа имеют свой максимум активности в 3 фракции, с легким сдвигом в сторону фракции 4 и 2. В экстрактах из лейкоцитов самая высокая активность была обнаружена у фракции 4, а в гемолизатах — у 4 и 5.

Для клинических нужд существенное значение имеет факт, что рост активности ЛДГ, наблюдаемый при разных заболеваниях, связан со сдвигом электрофоретического разделения активности ЛДГ в сыворотке. При патологических состояниях наблюдается распределение активности ЛДГ в сыворотке приближающееся к электрофоретическому распределению ее в патологически измененном органе.

Так, при инфаркте миокарда происходит избирательное повышение активности фермента в сыворотке в области пиков с подвижностью, соответствующей α_1 - и α_2 -глобулинам. Это явление сходно с распределением активности фермента в мышце сердца. При некоторых лейкозах имеет место увеличение активности ЛДГ сыворотки в диапазоне фракции α_2 -глобулинов, что соответствует активности фермента в лейкоцитах (196).

Рост активности ЛДГ во фракциях бета и гамма глобулинов при эпидемическом гепатите совпадает с распределением активности фермента в печеночной ткани. При прогрессирующей мышечной дистрофии наблюдается рост активности во фракциях α_1 - и α_2 -глобулинов (166). Распределение активности ЛДГ послужило также основанием для дифференцирования между гемолитической желтухой и желтухой печеночного происхождения. При гемолитической желтухе констатируется сходство распределения активности ЛДГ в сыворотке с распределением активности ЛДГ в эритроцитах, то есть в пределах пиков 4 и 5. Это распределение отличается от распределения при гепатогенной желтухе (пик 1) (218).

Явление, характерное для ЛДГ, которое состоит в том, что в разных органах имеются разные ферменты с одинаковыми каталитическими свойствами, или же в том, что в одном и том же органе встречаются разные ферменты с одинаковой специфичностью, получило название (Markert и Moller) „изозимии“, а соответствующие ферменты были названы „изозимами“ (115). Из приведенных выше примеров следует, что определение изозимов в сыворотке значительно повышает диагностическую специфичность ферментативных тестов для сыворотки.

Биологическое значение феномена изозимии до сих пор не выяснено. Распределение активности ЛДГ в разных тканях не связано с экто-, мезо- или энтодермальным происхождением последних. Полагают, что ткани с большой потребностью в кислороде, как сердце, почки, мозг содержат большую часть активности ЛДГ в быстродвижущихся фракциях 4 и 5. Метаболизм этих тканей в случае дефицита кислорода быстро падает. Наоборот, скелетная мышца, большая активность которой содержится в медленных фракциях, сравнительно хорошо приспособлена к работе в анаэробных условиях. Pfeleiderer и сотр. (160), на основании наблюдений, пришли к заключению, что в опухолевой ткани, независимо от происхождения, максимум активности обнаруживается во фракциях 1 и 2, или в медленных фракциях, так же как и в скелетной мышце. При асцитном раке (Ehrlich) активность наблюдается исключительно во фракции 1.

Исследование распределения активности ЛДГ у плодов показало, что у 3- и 4-месячного плода максимум активности ЛДГ миокарда находится в полосе 3, а в скелетных мышцах в полосе 3 и 2. По мере развития плода максимум перемещается: в мышце сердца в полосу 5, а в скелетных мышцах в полосу 1. Полоса 3, вероятно, является исходной. Отсюда происходит дальнейшее дифференцирование фракций ЛДГ (160).

Разделение ЛДГ на описанные выше фракции производится путем электрофореза на бумаге, на крахмальных блоках, на желе из агар-агара, а также на листках из ацетатной целлюлозы. Помимо электрофоретических методов, удалось дифференцировать разные ЛДГ также при помощи серологических способов (146, 161). Были получены антитела против ЛДГ сердца и печени. Антисыворотка против ЛДГ из печени сильно тормозила печеночный фермент, а также фермент из мышц и слабо действовала на ЛДГ из других тканей человека. Антисыворотка против ЛДГ из человеческого сердца сильно тормозила фермент сердечного происхождения, а также ферменты из почки, предстательной железы, мозга, эритроцитов, и лишь в незначительной сте-

пении подавляла активность ферментов из скелетных мышц и печени. Пользуясь такой сывороткой, можно было до известной степени дифференцировать происхождение ЛДГ в сыворотке (148).

В определенных условиях ДЭАЭ-целлюлоза (диэтиламинэтилцеллюлоза) связывает ЛДГ сердечного происхождения (с ЛДГ из почек и эритроцитов включительно), но ЛДГ печени (а также ЛДГ скелетных мышц) остается в растворе. Следовательно, по этому методу можно дифференцировать ЛДГ с точки зрения ее тканевого происхождения. Метод состоит в определении разницы активности пробы сыворотки до и после воздействия на нее ДЭАЭ-целлюлозы (90). Повышение активности ЛДГ сыворотки наблюдалось при инфаркте миокарда, при остром гепатите, злокачественных опухолях, злокачественном малокровии и др.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛДГ В СЫВОРОТКЕ

Спектрофотометрический метод по Wróblewski и La Due (219). Принцип метода заключается в измерении скорости уменьшения экстинкции НАД·Н₂ при 340 мμ во время реакции превращения пировиноградной кислоты в молочную. Подобный метод был применен Hill (91).

Инкубационная смесь имеет следующий состав: 2,4 мл фосфатного буфера 0,1 М, рН 7,4, 0,1 мл сыворотки и 0,1 мл раствора НАД·Н₂ (2,5 мг/мл). Компоненты смешивают и оставляют на 20 минут. Реакцию начинают, прибавляя 0,1 мл раствора пирувата натрия (2,5 мг/мл). Окончательный объем инкубационной смеси должен равняться 3 мл. Фотометрируют при 340 мμ и температуре 24—27°. Активность выражается в единицах по Wróblewski (см. стр. 141). У 161 здоровых лиц активность колебалась от 260 до 850 единиц, в среднем 470 ± 130 единиц. Не было обнаружено падения активности ЛДГ при хранении сыворотки в течение недели в холодильнике. Оксалатная плазма оказалась менее активной, чем гепариновая. Голодание не оказывало влияния на активность фермента. У одних и тех же лиц при ежедневном исследовании были обнаружены колебания активности ЛДГ до 30%.

Спектрофотометрический метод Zimmermann и сотр. (222). Метод состоит в определении скорости реакции при 340 мμ при превращении лактата в пируват. При рН 10 равновесие реакции смещается в сторону превращения лактата в пируват. Мерой активности является скорость роста Е при 340 мμ. Инкубационная смесь состоит из: 0,1 мл сыворотки, 0,1 мл НАД 0,02 М, 2 мл глицинового буфера 0,1 М, рН 10,0, 0,5 мл 0,5 М DL-лактата и 1,0 мл дистиллированной воды. Время инкубации 30 минут, температура 37°. Реакцию прекращают, погружая пробы в кипящую водяную баню на 3 минуты и спектрофотометрируют при 340 мμ, сравнивая с холостой пробой. Авторы выражают активность в μмолях образующегося НАД·Н₂ на 100 мл сыворотки. У здоровых лиц активность равнялась в среднем 181 единиц (80—250).

Колориметрический метод определения активности ЛДГ по Cabaud и Wróblewski (50). В присутствии НАД·Н₂ фермент восстанавливает пируват в лактат. Метод состоит в определении непрореагировавшей пировиноградной кислоты при помощи 2,4-динитрофенилгидразина. Это соединение образует с пировиноградной кислотой гидразон, концентрацию которого можно определить колориметрически в щелочной среде.

Реактивы: 1. Забуференный раствор пировиноградной кислоты рН 7,8—8,0; 0,2 г пировиноградной кислоты растворяют в мерной колбе емкостью в 1 л, добавляют 10 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ и доводят водой до метки. Годность субстрата до двух недель и дольше, при условии хранения в холодильнике. 2. Раствор НАД·Н₂, содержащий 10 мг веществ в 1 мл дистиллированной воды. Пользуются только свежеприготовленным раствором. 3. Раствор динитрофенилгидразина: 200 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 85 мл концентрированной соляной кислоты и доводят до 1 литра дистиллированной водой. 4. 0,4 Н NaOH.

Ход определения: отмеривают в пробирку 0,1 мл сыворотки, разбавленной в пропорции 1:6 (спинномозговая жидкость не разбавляется) и добавляют 0,1 мл НАД·Н₂. Смесь подогревают до 37°. Реакцию пускают в ход добавлением 1 мл смеси буфера с субстратом, предварительно подогретой до 37°.

После 30-минутной инкубации (точно) реакцию останавливают прибавлением 1 мл динитрофенилгидразина. Пробы вынимают из бани и ставят на 20 минут. Добавляют 10 мл 0,4 Н NaOH, перемешивают и колориметрируют через 5—10 минут при 550 мμ. При активности ЛДГ выше 2000 единиц повторяют определение, увеличивая разведение сыворотки вдвое. При особенно высоких активностях разведение сыворотки увеличивают. При расчете необходимо учесть разведение сыворотки.

Стандартизация метода состоит в применении понижающихся количеств смеси буфера и субстрата.

Авторы рекомендуют следующую стандартизацию:

№ пробы	Смесь буфер-субстрат в мл	Количество пирувата в μг	Дистиллированная вода в мл	Равновесная активность ЛДГ в единицах
1	1,0	200	0,1	0
2	0,8	160	0,3	280
3	0,6	120	0,5	640
4	0,4	80	0,7	1040
5	0,2	40	0,9	1530
6	0,1	20	1,0	2000

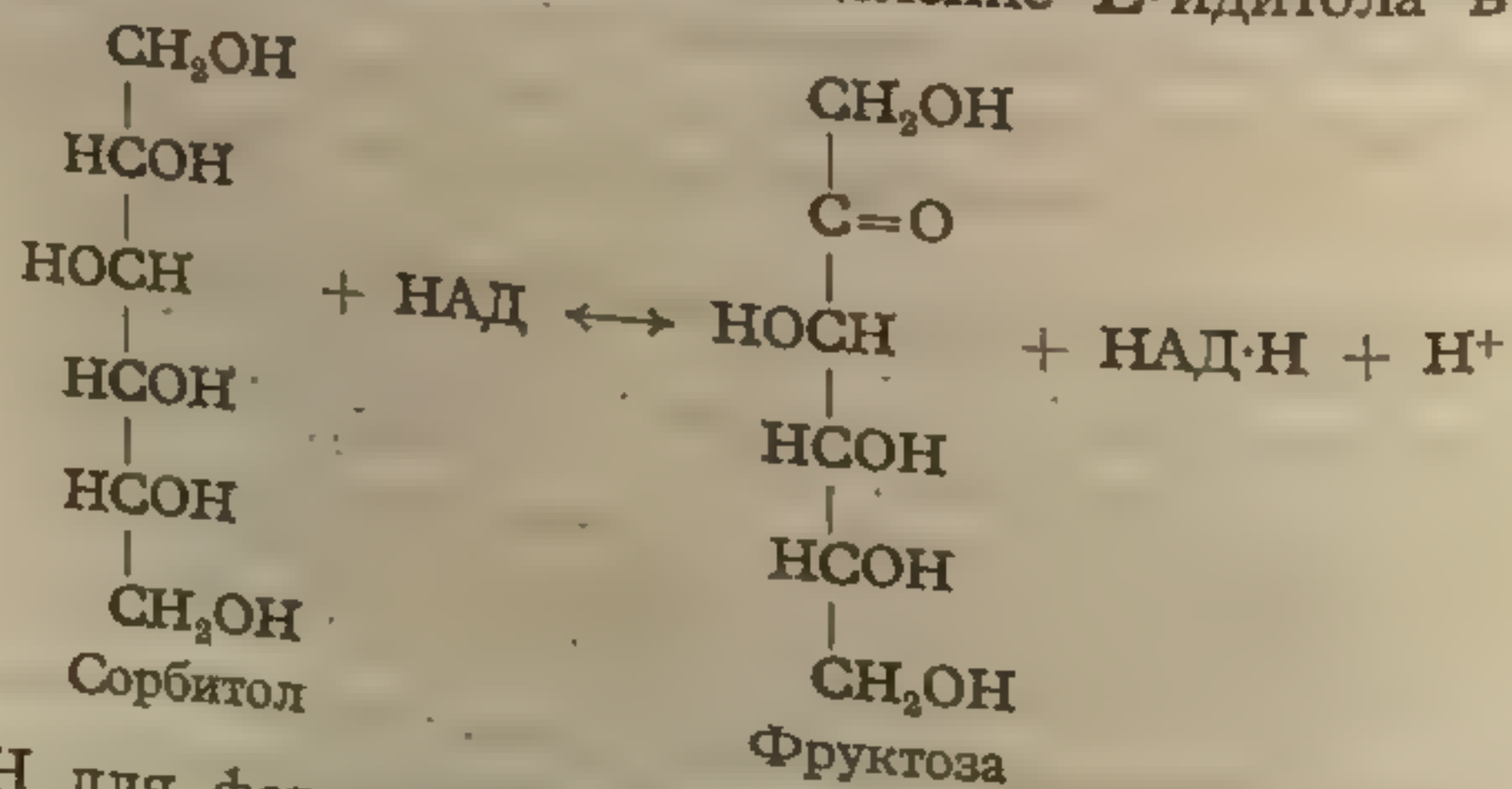
В каждую пробирку добавляют 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, оставляют стоять на 20 минут, затем прибавляют 10 мл 0,4 Н NaOH, перемешивают и отсчитывают через 5—10 минут. Активность фермента в единицах наносят на координаты в зависимости от результатов колориметрирования.

Активность фермента в норме колеблется от 200 до 500 единиц. В спинномозговой жидкости она составляет 0—40 единиц. Вместо сыворотки можно использовать гепаринизированную, но не оксалатную плазму, так как оксалаты, по-видимому, тормозят фермент. Следует избегать гемолиза, так как активность ЛДГ в эритроцитах в 100 раз выше, чем в сыворотке.

Рост активности ЛДГ в сыворотке наблюдается при инфаркте миокарда, лейкозах, злокачественном малокровии, болезнях печени, прогрессирующей мышечной дистрофии, при злокачественных новообразованиях и др.

L-ИДИТОЛДЕГИДРОГЕНАЗА — СОРБИТОЛДЕГИДРОГЕНАЗА (СДГ)

Еще в 1914 году было замечено, что перфузия печени голодающей собаки раствором, содержащим сорбитол, приводит к образованию восстанавливающего сахара, вероятно фруктозы (62). Дальнейшие исследования показали, что в печени животных находится фермент, катализирующий окисление сорбитола в фруктозу с участием НАД (26). Кроме окисления сорбитола фермент катализирует также обратимое окисление L-идитола в L-сорбозу.



Оптимум pH для фермента равен около 8,0. Бораты, цианиды, а также йодацетат оказывают тормозящее действие. Значительные количества фер-

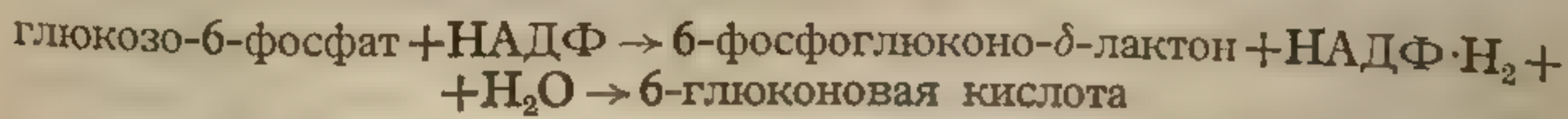
мента встречаются в печени и в почках. Остальные ткани практически не проявляют ферментативной активности. В физиологических условиях сыворотка не содержит фермент. Появление фермента в сыворотке указывает поражение печени (76).

Определение активности СДГ спектрофотометрическим методом Gerlach (77). Проба состоит в измерении скорости понижения $E_{\text{НАД}\cdot\text{H}_2}$ в системе, содержащей фермент и фруктозу в качестве субстрата. Отсчеты производятся при 366 или 340 $m\mu$. Инкубационная смесь состоит из: 0,1 мл раствора $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ (10 мг/мл), сыворотки до 1,0 мл и 0,2 М триэтаноламинового буфера с pH 7,4. Окончательный объем доводится до 3,0 мл. Реакцию пускают в ход добавлением 0,1 мл 40% фруктозы. Фотометрируют в течение 5—8 минут, через каждые 60 секунд, при температуре 24°. Понижение экстинкции в единицу времени пропорционально активности фермента. Ввиду присутствия в сыворотке тел, реагирующих с $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ (пировиноградная кислота) следует перед добавлением фруктозы отставить смесь на час, пока не прекратятся эти реакции.

Автор рекомендует единицу активности, равную количеству фермента в 1 мл сыворотки, которое при объеме 3,0 мл, температуре 24° и толщине кюветы в 1 см вызывает изменение E в течение 1 минуты на 0,001 при 366 $m\mu$. В сыворотке здоровых лиц активность фермента меньше единицы. Активность повышается при эпидемическом гепатите. Нормальное или незначительное повышение активности фермента встречаются при циррозе печени и механической желтухе. Schön и сотр. предложили метод определения активности СДГ в сыворотке, близкий описанному. По мнению авторов, фермент весьма чувствителен к ионам ртути и его полная ингибция происходит при концентрации 5×10^{-5} М HgCl_2 . У больного эпидемическим гепатитом 80% ферментативной активности было локализовано в пределах γ -глобулиновой фракции (171).

ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТ-ДЕГИДРОГЕНАЗА (Г-6-ФДГ)

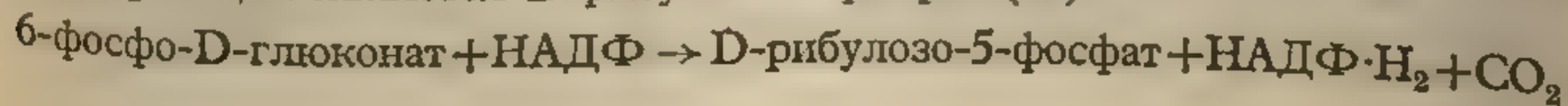
Этот фермент катализирует окисление глюкозо-6-фосфата в 6-фосфоглюконат при участии НАДФ. Он был открыт Warburg и сотр. и назван „Zwischenferment“. Это первый из ферментов на пути т.н. пентозного цикла глюкозы. Дальнейшие исследования привели к открытию промежуточного продукта этой реакции. В настоящее время известно, что реакция от глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконовой кислоты проходит в два этапа, по следующей схеме:



Активность фермента определяется спектрофотометрическим методом в системе, содержащей НАДФ, глюкозо-6-фосфат, буфер, хлористый магний и фермент (100). Сыворотка практически не проявляет никакой активности. Также у больных эпидемическим гепатитом только в исключительных случаях находят активность Г-6-ФДГ в сыворотке (170).

ФОСФОГЛЮКОНАТДЕГИДРОГЕНАЗА

Дальнейшее окисление 6-фосфоглюконовой кислоты катализируется специфической дегидрогеназой, коферментом которой служит НАДФ. Продуктом реакции является D-рибулозо-5-фосфат (92):



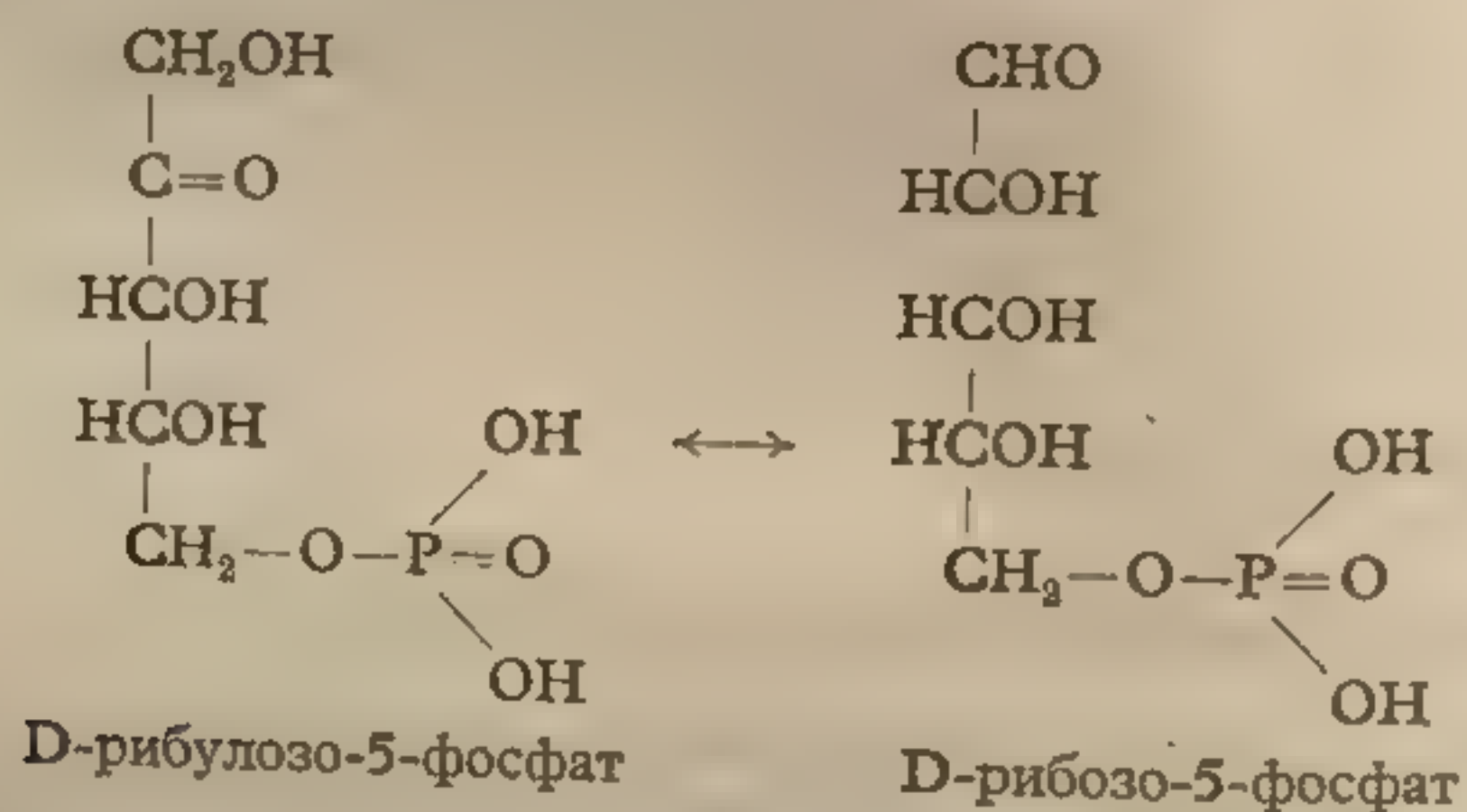
Определение активности фосфоглюконатдегидрогеназы в сыворотке по Wolfson и Williams-Ashman (217). Определение активности состоит в наблюдении скорости роста E при 340 мμ, во время восстановления никотинамидадениндинуклеотидфосфата.

Состав инкубационной смеси: 0,1 мл 0,5 М буфера Tris с pH 7,5, 0,05 мл 1,0 М раствора $MgSO_4$, 0,1 мл НАДФ 0,004 М в 0,15 М растворе NaCl, 0,1 мл 1% раствора цистеина с pH 7,5 (нейтрализуют $NaHCO_3$), 0,6 мл 0,15 М NaCl, 0,1 мл 0,01 М 6-фосфоглюконовой кислоты. Реакцию начинают добавлением 0,5 мл сыворотки. Холостая проба содержит вместо раствора 6-фосфоглюконата 0,1 мл раствора NaCl. При температуре 25° отсчитывают рост E при 340 мμ с 2—5 минутными интервалами в течение 12—30 минут. Активность вычисляют на основании отрезка кривой с кинетикой нулевого порядка и выражают ее в μмолях образующегося НАДФ· H_2 на 1 мл сыворотки в 1 час. Фосфоглюконатдегидрогеназа сыворотки теряет около 50% активности при температуре 4° в течение 4 дней. Активность фермента в эритроцитах в 450 раз выше, чем в плазме — даже следы гемолиза заметно влияют на результат определения.

Активность фермента составляет в среднем у здоровых лиц 137 ± 36 единиц (80—188).

РИБОЗОФОСФАТ-ИЗОМЕРАЗА (РФИ)

Этот фермент катализирует реакцию изомеризации между D-рибулозо-5-фосфатом (Ру-5-Ф) и соответствующей альдозой, т.е. D-рибозо-5-фосфатом (Р-5-Ф) (172).



В состоянии равновесия при температуре 37° в растворе находится 75% Р-5-Ф и 25% Ру-5-Ф. Фермент отличается большой специфичностью, так как другие фосфорнокислые эфиры сахаридов не подвергаются превращению при его участии. Ру-5-Ф может подвергаться дальнейшим ферментативным превращениям под влиянием рибулозофосфат-эпимеразы в D-ксилоулозо-5-фосфат (8, 183). Реакция состоит в изомеризации при 3 углероде.

Метод определения активности РФИ по Bruns (43). Этот метод является модификацией способа, предложенного Axelrod (9, 10, 11). Его сущность заключается в колориметрическом определении количества Ру-5-Ф, образующегося при воздействии фермента на Р-5-Ф, при помощи реакции с карбазолом по Dische (58).

Реактивы: 1) буфер Tris 0,1 М, pH 7,5; 2) 0,03 М раствор Р-5-Ф, pH 7,5; натриевую соль Р-5-Ф получают из бариевой соли путем осаждения бария сернокислым натрием. Содержание Р-5-Ф в растворе определяют по методу Meijbaum (120) в модификации Umbreit (2); 3) 10% трихлоруксусная кислота; 4) раствор H_2SO_4 (225 мл концентрированной H_2SO_4 + 95 мл H_2O); 5) 1,5% раствор карбазола в абсолютном этаноле.

Ход определения: инкубируют в течение 10 минут при температуре 37° 0,25 мл сыворотки с 0,25 мл H_2O , 0,5 мл буфера Tris и 0,5 мл субстрата. Реакцию прекращают 1,5 мл трихлоруксусной кислоты. В параллельной холостой пробе трихлоруксусную кислоту добавляют до введения субстрата. К 1 мл фильтрата, после добавления трихлоруксусной кислоты, приливают 6 мл серной кислоты, 0,2 мл цистеина и 0,2 мл раствора карбазола. За-

канчивают добавление реактивов по истечении 40 секунд. Возникает красно-фиолетовое окрашивание с максимумом поглощения при 540 мμ. Максимум окрашивания появляется через 3 часа пребывания в водяной бане, при температуре 37°. Пробы охлаждают и колориметрируют при 540 мμ.

Активность фермента выражают числом μмолей Ру-5-Ф (1 μмоль Ру-5-Ф — 230 μг Ру-5-Ф) образующегося при воздействии в течение часа 1,0 мл сыворотки на субстрат, при pH 7,5 и температуре 37°. Приготовление стандарта для описанного метода представляет некоторые затруднения. Лучше всего было бы отсчитать количество полученного Ру-5-Ф по стандартной кривой, составленной при помощи чистого Ру-5-Ф. Однако этот реактив довольно трудно достать. Стандартную кривую можно также составить следующим образом: наносят на координаты показания фотометра для количеств Ру-5-Ф, в реакционной смеси, при которых достигается состояние равновесия. Ввиду того, что в состоянии равновесия пропорция Р-5-Ф : Ру-5-Ф = 75 : 25, можно на основании исходного количества Р-5-Ф вычислить количество Ру-5-Ф, находящегося в смеси.

Другим способом стандартизации метода является хроматографическое разделение продуктов реакции. В системе этанол-борная кислота (80% этанол с 0,64% борной кислотой) Р-5-Ф имеет R_f 0,23—0,27, а Ру-5-Ф — R_f 0,44—0,49. Оба эфира локализуют на бумажных хроматограммах и в части фильтрата определяют интенсивность реакции с карбазолом сравнивая с содержанием фосфора изолированного хроматографически сложного эфира; тем самым определяют количество Ру-5-Ф.

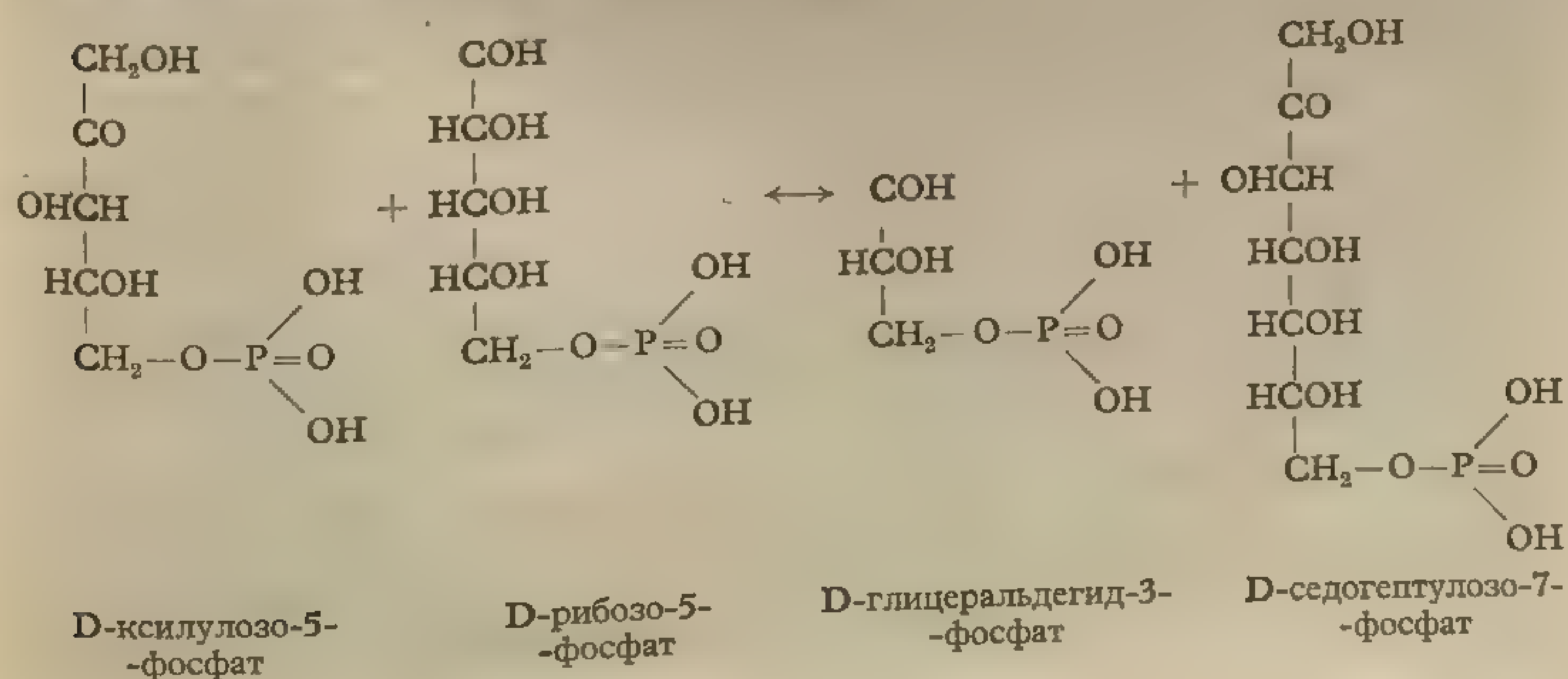
Активность фермента у здоровых лиц в среднем равнялась 3,5 μМ Ру-5-Ф на 1 мл сыворотки в 1 час. Не обнаружено различий в активности в зависимости от пола и возраста. Эритроциты весьма богаты этим ферментом; активность фермента в них в 1000 раз выше чем активность в сыворотке. Меньшей активностью фермента, чем эритроциты, отличаются почки, печень, миокард и скелетные мышцы. Термическая инактивация происходит при температуре выше 60°. Фермент находится также в спинномозговой жидкости.

Вопрос активности РФИ при разных патологических состояниях еще недостаточно разработан. Автор метода наблюдал рост активности фермента в 2 случаях лимфосаркомы, а также у одного больного лимфогрануломатозом.

РФИ эритроцитов зависит от наличия свободных SH-групп. Она сильно тормозится салирганом и параклормеркурибензоатом. Торможение ликвидируется цистеином. Также фосфаты оказывают тормозящее влияние на фермент (2). Фермент насыщается субстратом при концентрации 0,01 М Р-5-Ф.

ТРАНСКЕТОЛАЗА (ТК)

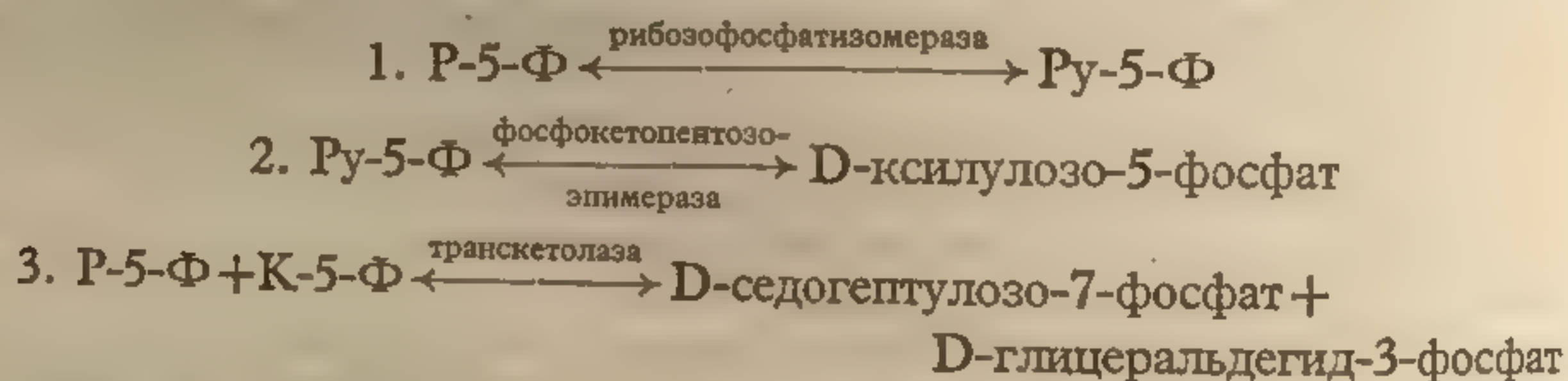
D-ксилулозо-5-фосфат (К-5-Ф) и D-рибозо-5-фосфат (Р-5-Ф) принимают участие в ферментативной реакции, состоящей в переносе кетольной группы —CO—CH₂OH с одной молекулы на другую. Фермент, катализирующий эту реакцию, называется транскетолазой.



Коферментом в этой реакции служит тиаминпирофосфат, сильно связанный с молекулой фермента. Донорами кетольных групп в ферментативной реакции могут быть, кроме D-ксилоулозо-5-фосфата, также D-седогептулозо-7-фосфат, D-фруктозо-6-фосфат и гидроксипируват. Акцепторами кетольной группы служат разные альдегиды, как рибозо-5-фосфат, гликольальдегид, D-глицеральдегид и D- или L-глицеральдегид-3-фосфат.

Активность ТК определяют спектрофотометрическим методом путем сопряжения реакции с реакциями, катализируемыми триозофосфат — изомеразой (ТИМ) и ферментом Baranowski (ГДГ) в присутствии НАД·Н₂. Образующийся в ходе транскетолазной реакции D-глицеральдегид-3-фосфат изомеризируется посредством ТИМ в фосфодигидроацетон, который впоследствии восстанавливается в α-глицерофосфат, благодаря присутствию ГДГ и НАД·Н₂. В такой системе скорость исчезновения полосы поглощения НАД·Н₂ при 340 мμ является мерой активности фермента.

Колориметрический метод определения активности транскетолазы по Bruns и сотр. (44). Принцип метода состоит в колориметрическом определении количества образующегося седогептулозо-7-фосфата по методу Dische (59). Субстратом при этом методе служит D-рибозо-5-фосфат, вследствие чего собственно транскетолазной реакции предшествуют две другие ферментативные реакции:



По мнению автора метода, первые две реакции протекают во много раз скорее, чем транскетолазная реакция, следовательно, последняя имеет решающее значение для скорости образования седогептулозо-7-фосфата.

Реактивы: 1) буфер Tris 0,1 М рН 7,6; 2) 0,01 М раствор рибозо-5-фосфата, рН 7,6. К раствору приливают каплю толуола и хранят в замороженном виде. 3) 10% трихлоруксусная кислота; 4) концентрированная соляная кислота, чистая для анализа, уд. вес 1,19; 5) раствор хлористого железа (13 мг FeCl₃ в 100 мг 2N HCl); 6) 6% раствор орцина в метаноле; 7) 95% этанол.

Ход анализа: 1 мл сыворотки и 0,5 мл буфера Tris, содержащего субстрат, инкубируют при температуре 37° в течение 2—4 часов. Для определения активности в эритроцитах инкубируют 0,5 мл гемолизата 1 : 10, 0,5 мл буфера Tris и 0,5 мл раствора P-5-Ф в течение 15—60 минут. Прекращают реакцию 1,5 мл трихлоруксусной кислоты. В качестве холостой пробы инкубируют буфер и субстрат, затем приливают трихлоруксусную кислоту и фермент. Для определения седогептулозо-7-фосфата, 1 мл фильтрата, после осаждения белка трихлоруксусной кислотой, и 0,2 мл концентрированной соляной кислоты в малых пробирках с притертой стеклянной пробкой подогревают в кипящей водяной бане в течение 80 минут. После охлаждения к смеси добавляют 0,2 мл FeCl₃ и 0,075 мл раствора орцина, тщательно перемешивают и повторно подогревают в течение 3 минут в кипящей водяной бане. Образуется сине-зеленое окрашивание с максимумом поглощения при 590 мμ. После добавления равного количества спирта (1,475 мл) окрашивание становится синим, а максимум смещается к 625 мμ, причем интенсивность окраски заметно увеличивается; оставляют пробы на 3 часа при комнатной температуре и колориметрируют при 625 мμ, сравнивая с холостой пробой. Окрашивание сохраняется по крайней мере в продолжение 24 часов.

Стандартную кривую составляют при помощи раствора бариевой соли седогептулозо-7-фосфата (8,3 мг на 10 мл 0,1 N HCl), в котором, после удаления бария, определяют количество сложного эфира, после предварительного ферментативного гидролиза кислой фосфатазой картофеля.

Активность фермента выражают числом μ молей С-7-Ф, образуемого при заданных условиях 1 мл сыворотки в 1 час.

У 15 здоровых лиц активность фермента составляла 0,049 (0,023—0,085). Оптимум рН фермента расположен при рН 7,4. Фосфатный буфер тормозил активность транскетолазы. Быстрее всего проходила реакция в сыворотке при температуре 50—55°, а в гемолизатах при температуре 45°. Автор наблюдал некоторое повышение активности фермента в сыворотке при эпидемическом гепатите и при уремии; в некоторых случаях сахарного диабета активность транскетолазы была понижена.

АМИЛАЗА (Ам)

Амилаза была открыта одной из первых. Ее присутствие в слюне было описано уже в 1831 году (105). Затем фермент был обнаружен в крови, моче и поджелудочной железе. В последние годы поступили сообщения о получении кристаллических препаратов α -амилазы из слюны человека (133, 141), а также из поджелудочной железы человека (63). α -амилаза встречается в животном и растительном мире. Она гидролизует α -1,4-гликозидную связь у таких полисахаридов, как гликоген и крахмал, а также продукты их распада. Фермент не действует на связи α -1,6, находящиеся в молекуле гликогена и амилпектина, в месте разветвления цепей. В результате воздействия α -амилазы на упомянутые полисахариды образуются олигосахариды (декстрины), впоследствии разлагаемые на мальтозу и низкомолекулярные продукты с разветвленной цепью.

В связи с тем, что α -амилаза действует на молекулу крахмала в ее середине, ее считают эндоамилазой. Вязкость раствора, на который действует фермент, быстро уменьшается; исчезает окрашивание, образуемое молекулой крахмала с раствором йода, зато восстановительная способность растет во время распада.

Помимо α -амилазы, в растительном мире существует β -амилаза. Она действует на молекулу крахмала со стороны невосстанавливающего конца гликозидной цепи, отщепляя молекулу мальтозы; следовательно α -амилаза является экзоамилазой. II этот фермент атакует исключительно связь α -1,4 в полисахаридной цепи. Его действие прекращается у связей α -1,6, т.е. в месте разветвлений. В результате этого действия фермента образуются высокомолекулярные „крайние декстрины“, вязкость раствора немного уменьшается, положительная реакция с раствором йода сохраняется, но в ходе реакции относительно быстро освобождаются восстанавливающие сахара. β -амилаза обязана своим названием тому, что фермент превращает молекулу крахмала в β -аномерную форму мальтозы.

α -Ам является слабокислым белком с изоэлектрической точкой между рН 4,6 и 5,2 и с молекулярной массой около 50000. Кристаллическая амилаза из человеческой слюны обладает изоэлектрической точкой около рН 5,3. α -Ам содержит в молекуле не менее одного грамма кальция на моль фермента, причем этот ион имеет существенное значение для активности фермента. Ионы кальция стабилизируют фермент и предохраняют его от потери активности и распада под влиянием протеолитических ферментов. Уменьшение активности после диализа или инкубации с соединениями, связывающими металлы, как фториды, цитраты, оксалаты или этилендиаминтетрауксусная кислота, объясняется удалением кальция из фермента.

Необходимым условием деятельности α -Ам у млекопитающих является наличие хлористых ионов. Амилаза достигает полной активности при концентрации 0,01 М ионов Cl^- . Цитраты тормозят фермент.

α -Ам млекопитающих обладает оптимумом pH между 6,0 и 7,0. α -Ам человеческой слюны активна при pH в пределах от 3,8 до 9,4, причем оптимум действия находится при pH 6,9. Существенное значение для деятельности фермента имеет вероятно свободная аминогруппа и карбоксильная группа в ферменте.

Наиболее богаты амилазой поджелудочная и слюнные железы. Постоянная активность амилазы наблюдается в печени, мышечном соке, моче и человеческом поте. Амилаза была также обнаружена в кале и женском молоке. Большая часть Ам крови происходит, вероятно, из поджелудочной железы, хотя не исключаются и другие источники, так как у собак с удаленной поджелудочной железой по-прежнему находили активность амилазы в крови. В случаях увеличения активности амилазы в крови ее источник следует искать в поджелудочной железе, или, реже, в слюнных железах. Перевязка выводящего протока поджелудочной железы приводит к значительному росту активности Ам в крови в течение 24 часов. Подобное явление имеет место при перевязке слюнного протока. Максимум активности достигается через 2—3 дня, после чего активность фермента медленно падает. Кристаллическая α -амилаза из человеческой слюны тождественна кристаллическому ферменту, изолированному из поджелудочной железы (23, 24). Из 1500 мл слюны получают около 150 мг кристаллической амилазы.

Активность амилазы в крови, по-видимому, не зависит от пола исследуемых лиц, рода и времени приема пищи. В сыворотке новорожденных не наблюдается активности амилазы; она появляется лишь на втором или третьем месяце жизни и достигает в течение первого года жизни ребенка активности, характерной для взрослых.

Определение активности амилазы в моче и в крови имеет диагностическое значение в первую очередь при остром панкреатите или закупорке выводящего протока поджелудочной железы, что приводит к повышению активности фермента в крови. Рост активности фермента наблюдается также при эпидемическом паротите (94, 88, 180, 54). Понижение активности амилазы в моче наблюдалось при нефрите. Понижение активности Ам в спинномозговой жидкости было описано при сифилисе центральной нервной системы (113); оно по всей вероятности обусловлено уничтожением фермента бледной спiroхетой.

Методы определения амилазы основаны на разных принципах. Мерой активности может быть например рост восстановительной способности раствора амилазы или амилопектина, изменение способности субстрата давать цветной комплекс с раствором йода, а также уменьшение вязкости крахмального субстрата. В польской и мировой литературе описано много методов определения активности амилазы, основанных на упомянутых принципах.

Определение активности амилазы сыворотки по Wohlgemuth (215): Этот метод, разработанный еще в 1908 году, применяется по сегодняшний день многими лабораториями. Однако, вследствие неточности этого метода, его следует считать только ориентировочным.

Реактивы: 1) 0,9% раствор хлористого натрия; 2) 1% раствор растворимого крахмала в 0,9% растворе NaCl. Перед употреблением раствор разбавляют десятикратно; 3) 0,02 N раствор йода.

Ход анализа: в пробирку, обозначенную № 1 отмеривают NaCl 2 мл сыворотки; в ряд пробирок с дальнейшими номерами отмеривают по 1 мл 0,9% NaCl. Переносят 1 мл сыворотки из первой пробирки в следующую, перемешивают с находящейся в ней солью и снова переносят 1 мл смеси в очередную пробирку. Таким образом получается ряд разведений сыворотки от 1 : 1 до 1 : 128 и выше. Во все пробирки отмеривают по 2 мл раствора крахмала и ставят в водяную баню с температурой 38°, на 30 минут. Затем охлаждают пробирки и до-бавляют, начиная с пробирки с самым высоким разведением, по 1 капле раствора йода.

Синес окра-
пробирку, в
реакции с й
Расчет:

По этому
в условиях
Определе
комендуется
с pH 6,8, а
Крахмалы
условии хра

Нормаль
указывают
Опреде
субстрат
тогда Van

Раствор
натрия и 4,3
(Merck) в не
нуту. Охлаж
Он должен
0,1 N зап
калия раство
рованной со
Рабочий
добавляют 5
раствора окс
Ход опр
по 50 мл (ис
пературой 37
пробу не ин
добавляют н
доводят вод
Расчет:

Е контро

При актив
физиологиче
По этому ме
костях. Кол
шить до тако
Мерой стой
метода утвер
по-видимому

Единице
лизующее
с йодом.
Нормаль
фермента
Опреде
Метод сос
бождаемь
и сотр. (1

Синее окрашивание указывает на наличие неразложенного крахмала. Для расчета берут ту пробирку, в которой разложился весь крахмал, то есть последнюю пробирку, не дающую реакции с йодом.

Расчет:

$$\frac{2}{\text{мл неразведенной сыворотки}} = \text{единицы амилазы}$$

По этому методу, 1 единица соответствует количеству фермента, способному разложить, в условиях опыта, 1 мг крахмала до продуктов, не дающих реакции с йодом.

Определение активности амилазы в моче производится подобным образом, однако, рекомендуется вместо 0,9% NaCl пользоваться для разбавления фосфатным буфером М/15 с рН 6,8, а в качестве конечного субстрата применять 0,1% раствор крахмала в 0,5% NaCl.

Крахмальные субстраты, применяемые при этих методах, неустойчивы, и даже при условии хранения с каплей толуола их обновляют каждые 3 дня.

Нормальной считают активность до 32 единиц. На несомненную патологию указывают лишь результаты выше 128 единиц.

Определение активности амилазы со стойким крахмальным субстратом по Сагауэ (51). Этот метод представляет модификацию метода Van Loon и сотр. (193).

Раствор субстрата: кипятят 13,3 г безводного двухзамещенного фосфорнокислого натрия и 4,3 г бензойной кислоты с 250 мл воды. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала (Merck) в небольшом количестве холодной воды и вводят в кипящую смесь. Кипятят 1 минуту. Охлаждают и доводят водой до 500 мл. Раствор устойчив при комнатной температуре. Он должен сохранять прозрачность.

0,1 N запасной раствор йода: 3,567 г йодноватокислого калия (KJO_3) и 45 г йодистого калия растворяют в 800 мл воды и медленно, при помешивании, добавляют 9 мл концентрированной соляной кислоты, а затем доводят объем водой до 1000 мл.

Рабочий раствор йода 0,01 N: растворяют 25 г фтористого калия в 350 мл воды, добавляют 50 мл запасного раствора йода и доливают водой до объема 500 мл. Годность раствора около 2 месяцев, при условии хранения в посуде из темного стекла, в холодильнике.

Ход определения: отмеривают по 5 мл крахмального субстрата в 2 колбочки емкостью по 50 мл (испытуемая и холостая пробы). Испытуемую пробу ставят в водяную баню с температурой 37°. Через 5 минут добавляют к ней 0,1 мл сыворотки и перемешивают. Холостую пробу не инкубируют. Через 7 1/2 минут инкубации вынимают пробу из бани и немедленно добавляют в обе колбочки по 5 мл рабочего раствора йода. Объем реактивов в колбочках доводят водой до 50 мл и немедленно отсчитывают экстинкцию растворов при 660 мμ.

Расчет:

$$\frac{E \text{ контрольной пробы} - E \text{ испытуемой пробы}}{E \text{ испытуемой пробы}} \times 800 = \text{единицы амилазы на 100 мл}$$

При активностях выше 400 единиц сыворотку перед определением пятикратно разбавляют физиологическим раствором поваренной соли, а результат соответственно умножают на 5. По этому методу можно определять амилазу также в моче и других биологических жидкостях. Количество употребляемых растворов и окончательный объем пробы можно уменьшить до такой степени, чтобы для проведения пробы было достаточно 0,001 мл сыворотки. Мерой стойкости субстрата непосредственно служит его E в контрольных пробах. Автор метода утверждает, что E контрольных проб не изменялась в течение года. Бензоат натрия, по-видимому, не оказывает влияния на активность фермента.

Единицей амилазы для этого метода является количество фермента, гидролизующее 10 мг крахмала в течение 30 минут, до исчезновения реакции с йодом.

Нормальный уровень амилазы равняется от 60 до 160 единиц. Активность фермента определяют сразу после взятия проб крови.

Определение активности амилазы по Meyer, Fuld и Bernfeld (134). Метод состоит в определении количества восстанавливающих сахаров, освобождаемых во время действия фермента. Он был введен впервые Sumner и сотр. (184, 185).

Реактивы: 1) раствор субстрата: 30 мл фосфатного буфера М/15, рН 6,8; 10 мл М/15 раствора NaCl и 1 г растворимого крахмала (Merck), предварительно разведенного в большом количестве теплой воды, перемешивают и доводят водой до объема 100 мл; 2) цветной реактив. Растворяют 1,0 г 3,5-динитросалициловой кислоты и 30,0 г виннокислого натрия-калия в 20 мл 2 Н NaOH и доводят объем водой до 100 мл. Раствор предохраняют от CO₂. Отставляют на два дня и в случае помутнения фильтруют (в темноте реактив сохраняет годность в течение нескольких месяцев).

Ход определения: отмеривают в ряд пробирок по 1 мл субстрата, подогревают до 37° и пускают в ход ферментативную реакцию, добавляя 1 мл фермента (плазма, моча и другие). Инкубируют 10 минут, затем прекращают реакцию 2 мл динитросалициловой кислоты. Подогревают в течение 5 минут в кипящей водяной бане, а затем охлаждают под проточной водой. Доводят пробы водой до 20 мл и колориметрируют коричневый продукт восстановления при 530 мμ, сравнивая с контрольными пробами.

Количество мальтозы, освобождаемой во время ферментативной реакции, находят по стандартной кривой, составляемой по раствору, содержащему от 0,2 до 2,0 мг мальтозы в 2 мл. Ферментативную активность выражают в мг мальтозы, освобождаемой 1 мл раствора фермента, в условиях данного метода.

МУРАМИДАЗА — ЛИЗОЦИМ

Издавна были известны антибактериальные свойства ряда биологических жидкостей. Эти свойства частично приписывают находящемуся в них лизоциму. Первое наблюдение, свидетельствующее о присутствии в белке куриного яйца вещества, обладающего способностью растворять (лизис) *Bacillus subtilis*, принадлежит Laschtschenko (104). Затем Сузуки наблюдал лизис культуры микрококков под влиянием экстрактов из лейкоцитов (188), но Fleming тщательно исследовал это вещество, выявил его ферментный характер и назвал его лизоцимом.

Лизоцим представляет собой белок с молекулярной массой около 14000, который обладает способностью растворять ряд бактерий. Изoeлектрическая точка лизоцима находится между 10,5 и 11,0, следовательно его характеризует щелочная реакция (3), обусловленная большим содержанием основных аминокислот в молекуле (98). Лизоцим в кислой среде сохраняет активность даже при температуре 100°, но в щелочной среде его активность исчезает быстро после подогревания. Источником для получения очищенного лизоцима служит белок куриного яйца. Сообщают о получении кристаллических препаратов лизоцима (1, 4). Однако, даже кристаллические препараты лизоцима оказались негомогенными. Дальнейшая очистка препарата производилась путем разделения на колонках ионного обменника Amberlite IRC 50 × E 64 (190).

Лизоцим вероятно представляет собой мукополисахаридазу, так как он вызывает деполимеризацию мукополисахаридов, входящих в качестве главного компонента в состав оболочки бактериальной клетки. Этим объясняется литическое действие лизоцима на бактерии. Лизоцим яичного белка отличается β-глюкозаминидазной активностью, так как он гидролизует хитин, причем продукты реакции обладают высокой молекулярной массой и характером полисахаридов (20). Субстраты с низкой молекулярной массой в слабой степени подвержены воздействию лизоцима. Допускается возможность, что полисахарид, уязвимый для лизоцима, состоит с повторяющихся единиц N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмуравьиной кислоты, причем удар направлен на β связь (1→4) (37).

Бактериолитический диапазон лизоцима весьма широк. В определенных условиях, он действует литически как на грамположительные бактерии (*M. lysodeicticus*, *B. megatherium* и *Sarcina flava*), так и на грамотрицательные, например *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Azotobacter vinelandi*. Amano и сотр. (5) (161) обнаружили, что усиление бактериолитической иммунитетной

системы экзогенным лизоцимом значительно ускоряет конверсию граммотрицательных палочек в сферопласты и ускоряет их отмирание. При исследовании роли лизоцима в системе иммунитета, Metzger (125) показал, что лизоцим сыворотки и биологических жидкостей принимает участие в реакции фиксации бледных спирохет, вызывая растворение неантигенной полисахаридной оболочки и обнажение рецепторов для специфического антитела и комплемента. Прибавление лизоцима резко сокращает срок, необходимый для иммобилизации бледных спирохет (123). На основании этого наблюдения Metzger (124) разработал модификацию реакции иммобилизации бледных спирохет (реакция Nelson-Mayer) с прибавлением лизоцима, позволяющую отсчитывать результаты через 6 часов инкубации вместо 18 часов по оригинальному методу.

Лизоцим широко распространен в природе; у человека он встречается в слезах, слюне, сыворотке, слизи носа и во многих тканях.

Физиологическое значение лизоцима не изучено в достаточной степени. Предполагают, что он защищает организм от вторжения микроорганизмов.

Содержание лизоцима в слезах и слюне, возможно, объясняет редкость инфицирования слизистой рта и глаза, при неповрежденном эпителии, несмотря на постоянное присутствие инфекционных факторов в среде. Эту же роль приписывают и лизоциму сыворотки, который по всей вероятности, происходит из лейкоцитов (70).

Некоторое количество лизоцима выделяется с калом. Количество выделяемого этим путем лизоцима резко увеличивается при язвенном колите, превышая иногда в 170 раз значение нормы (81). По мере улучшения состояния больных, количество выделяемого лизоцима уменьшается. Некоторые исследователи полагают, что рост выделения лизоцима имеет большое значение в патогенезе язвенного колита. Этот фермент, растворяя слой слизи, лишает слизистую защитной оболочки, что по-видимому способствует образованию изъязвлений. Повышенное выделение лизоцима с калом наблюдается также при болезни Крона (терминальный илеит) (135), язве желудка (136), а также в желудочном содержимом, при аллергических заболеваниях (48). Рост уровня лизоцима в моче был описан при болезнях почек (49).

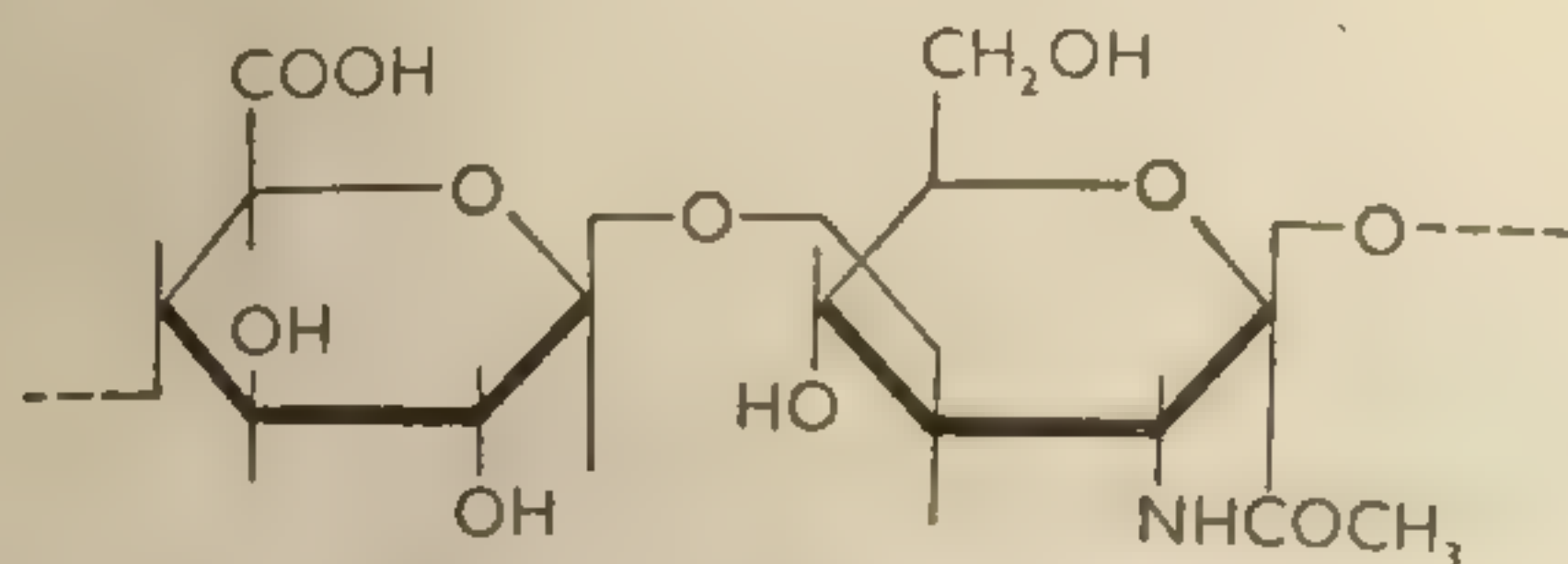
Для определения активности лизоцима часто применяют бактериологический метод, введенный Fleming. Этот метод состоит в определении уменьшения, под влиянием фермента, помутнения, обусловленного взвесью *Micrococcus lysodeicticus* (72). Вискозиметрический способ заключается в определении уменьшения вязкости в полисахаридном субстрате под влиянием фермента.

ГИАЛУРОНИДАЗА — ГИАЛУРОНАТ-ЛИАЗА (ГР)

Этот фермент широко распространен в человеческих тканях; его действие состоит в гидролизе гиалуроновой кислоты, полисахарида, полимера, состоящего из остатков глюкуроновой кислоты и N-ацетилглюкозамина, связанных попеременно между собой (137, 138).

Субстрат гиалуронидазы, т.е. гиалуроновая кислота, близок хондроитинсерной кислоте находящейся в тканях мезодермального происхождения. Особенно большие количества гиалуроновой кислоты встречаются в стекловидном теле глаза, пуповине, сухожилиях, студенистом ядре межпозвоночного тела глаза, пуповине, сухожилиях, студенистом ядре межпозвоночных хрящей, синовиальной жидкости и др. Гиалуроновая кислота считается мукополисахаридом, причем ее молекулярная масса колеблется от 100000 до нескольких миллионов. Основной структурной единицей, повторя-

щейся в молекуле гиалуроновой кислоты, является N-ацетил-биуро-
вая кислота, продукт воздействия гиалуронидазы яичек на гиалуроновую
кислоту (210).



Гиалуронидаза тождественна т.н. фактору распространения (*spreading factor*),
ускоряющему распространение вводимых внутрикожно пигментов или токси-
нов (60, 53). Особенно большие количества фермента встречаются в яичках,
что связано с наличием гиалуронидазы в семени. Фермент находится также
в ряде других тканей, и в сыворотке. Присутствие гиалуронидазы было об-
наружено у многих бактерий. Препарат ГР получают обычно из яичек быка.
Оптимум pH для фермента в значительной степени зависит от присутствия
и концентрации солей в реакционной смеси. По Meyer, при постоянной кон-
центрации NaCl, оптимум pH для гиалуронидазы яичек широк (3,8—5,4)
(165).

ГР яичек гидролизует, помимо гиалуроновой кислоты, также мукоитино-
вую и хондроитин-серную кислоты.

Гистоны, протамины и пептоны оказывают активирующее влияние на ГР
(155). Ее активирует также хлористый натрий. Компетитивными ингибиторами
ГР являются ацетилированные и нитрированные производные гиалуроновой
кислоты, хондроитинсульфат, гепарин и другие антикоагулянты, как дику-
марол. Ингибирующее влияние на ГР оказывают также: салициловая кислота,
хиноны, фенолы, ионы Fe^{+++} и Cu^{++} , адреналин, морфин, антигистаминные
средства, рутин. Пепсин и трипсин инактивируют гиалуронидазу (84, 54a,
116, 82a, 107, 220, 221).

Гиалуроновая кислота деполимеризуется под влиянием разных кофермент-
ных факторов. Таким образом действует аскорбиновая кислота в присутствии
ионов Cu^{++} и диазосоединения (117, 178). Этим свойством обладают соли тя-
желых металлов и ультразвуки (96). Во избежание возможных ошибок, при
определении ферментативной активности гиалуронидазы рекомендуется при-
нимать соответствующие меры предосторожности.

Физиологическое значение ГР остается спорным. Гиалуроновая кислота
представляет во внеклеточном веществе соединительнотканной стромы свое-
образный слой, от которого зависит диффузия разных веществ и обмен жид-
костями между клетками и окружающей их средой. ГР, находящаяся в значи-
тельном количестве в некоторых бактериях, путем деполимеризации гиалуро-
новой кислоты стромы, может иметь значение в механизме их проникновения
в ткани. Взаимоотношение гиалуронидазы и гиалуроновой кислоты с одной
стороны и вирулентности бактерий с другой подробно обсуждается в работах
Zabłocki (220, 221).

Предполагают, что ГР, находящаяся в яичках, может иметь значение в про-
цессе оплодотворения (118). Согласно этой теории, фермент семени разруш-
ляет слой клеток, окружающих яйцо. Эти клетки соединены друг с другом
посредством гиалуроновой кислоты, деполимеризация которой облегчает
проникновение сперматозоида и оплодотворение яйца. ГР, содержащаяся
в семени, по мнению некоторых авторов, облегчает также прохождение спер-
матозоидов в полость матки, растворяя слизистую пробку в шейке матки.

Однако, не все исследователи согласны с таким толкованием роли гиалуронидазы семени. Ряд авторов вообще отказывает гиалуронидазе в каком бы фермент неспособен растворять слизистую пробку в шейке матки.

Гиалуронидаза является белком. Инъекция гиалуронидазы животным вызывает образование специфических антител, называемых антигиалуронидазами. Последние специфичны по отношению к разным ГР, вводимым в качестве антигенов. В физиологических условиях в глобулиновой фракции сыворотки можно обнаружить небольшое количество антигиалуронидаз, специфичных по отношению к ферментам из гемолитических стрептококков, стафилококков и пневмококков (74, 163, 85, 86). При инфекциях, вызываемых этими бактериями, производящими ГР, можно в сыворотке обнаружить повышение титра этих антител. Они термостабильны, т.е. не подвержены инактивации при подогревании в течение 30 минут, при температуре 56°. Уровень антител против стрептококковой ГР в сыворотке выше у больных суставным ревматизмом, чем у здоровых.

Кроме этих специфических ингибиторов, в плазме имеются неспецифические подавляющие факторы, отличающиеся термостабильностью. Это белковые тела, движущиеся в электрофорезе с фракцией глобулинов (79). Неспецифический ингибитор из человеческой крови был очищен в 100 раз. Его молекулярная масса равняется 100 000 (19). Наряду с аминокислотами, в молекуле ингибитора были обнаружены фрагменты сахаров. Неспецифический ингибитор ГР является, вероятно, звеном общего защитного механизма. Сила действия неспецифических ингибиторов по отношению к разным ГР неодинакова. Уровень их активности не зависит от возраста и пола. Он повышается при злокачественных новообразованиях и остром суставном ревматизме, причем наблюдается известный параллелизм с температурой тела и РОЭ. Zabłocki (220, 221) выявил присутствие теплоустойчивого ингибитора для ГР яичек в сыворотке больных ревматизмом и туберкулезом легких. Этот ингибитор отличается от специфических антител (антигиалуронидаз). Титр этого ингибитора находится в корреляции с РОЭ.

Гормональная система, вероятно, оказывает влияние на систему гиалуронидаза — гиалуроновая кислота. Самое большое количество работ было посвящено влиянию кортикостероидов. Кортикостероиды, по-видимому, тормозят *in vivo* активность ГР (121). После приема кортизона и АКТГ происходит уменьшение количества гиалуроновой кислоты в соединительной ткани (7). Эстрогены также вызывают изменения уровня гиалуроновой кислоты в соединительной ткани, а также изменения консистенции и упругости подкожной клетчатки в связи с менструальными циклами. Особенно бросается в глаза связь между щитовидной железой и системой гиалуронидаза-гиалуроно-вая кислота. При микседеме в подкожной клетчатке констатируют необычайно высокое количество гиалуроновой и хондроитин-серной кислот (209).

ГР находится также и в сыворотке, что было обнаружено сравнительно недавно (87, 78). Понижение активности ГР сыворотки было описано у больных с отеками сердечного происхождения, в случаях плевральных и перитонеальных транссудатов, при циррозе печени, лихорадочных заболеваниях, а также у больных новообразованиями (194).

ГР нашла широкое применение во многих отраслях медицины, как терапевтическое средство. Ее прибавляли к подкожным инфузиям с целью ускорения резорбции жидкостей из подкожной ткани (169), она входила в состав внутримышечных впрыскиваний и жидкостей для местного обезболивания. Ее применяли при парафимозе (165a), для ускорения резорбции гематом,

при плевральных выпотах (18, 97), при лечении некоторых осложнений туберкулеза легких (75), для устранения келоидов и при многих других болезнях (158).

При злокачественных новообразованиях было обнаружено присутствие как гиалуронидазы, так и гиалуроновой кислоты. Boyland и McClean (33) заметили, что скорость роста опухоли пропорциональна содержанию в ней гиалуронидазы. На этом основании были сделаны выводы, что присутствие ГР в новообразованиях может быть причиной инфильтрирующего роста опухоли. Эти взгляды не подтвердились в дальнейших исследованиях (173).

Методы определения ГР зависят в значительной степени от рода применяемого субстрата, степени его полимеризации, наличия загрязнений и др. Эти методы используют физико-химические, химические и биологические превращения, происходящие в субстрате под влиянием фермента. Из более распространенных методов следует упомянуть о методе, сущность которого состоит в предупреждении образования муцинного сгустка в растворах гиалуроновой кислоты, после их разбавления и подкисления. Это чувствительный, но лишь только полуколичественный метод. Чаще всего пользуются вискозиметрическими способами. Они состоят в определении уменьшения вязкости растворов субстрата во время деполимеризирующего действия ГР. В сильно разбавленных растворах, в присутствии избытка белка, гиалуроновая кислота образует после подкисления муть, а не муцинный сгусток, что также используется для количественного определения активности ГР. Из химических методов иногда применяют определение количества образующихся во время действия фермента восстанавливающих соединений. Из биологических методов, дающих наименее верные результаты, чаще других пользуются методами, основанными на свойстве ГР как фактора распространения (*spreading factor*), причем измеряют скорость расширения пятен, возникающих после подкожного впрыскивания цветных жидкостей.

Гиалуроновая кислота ускоряет оседание эритроцитов, как *in vitro*, так и *in vivo* (Zabłocki), а гиалуронидаза этому противодействует. Это свойство ГР используется для определения активности фермента (220). Описаны также методы определения активности ГР в сыворотке и измерения активности ингибиторов фермента (21, 22, 194).

β -ГЛЮКУРОНИДАЗА (β -ГР)

Этот фермент катализирует гидролиз β -глюкуронатов, соединений, являющихся производными β -глюкуроновой кислоты и разных фенолов, алкоголей и карбоновых кислот. Образование соединений глюкуроновой кислоты считается одним из механизмов детоксикации, имеющих целью удаление из организма некоторых продуктов обмена, получающихся в организме при физиологических условиях или вводимых извне. Общеизвестно выделение кортикостероидов с мочой в сочетании с глюкуроновой кислотой, а также выделение в этой форме некоторых половых гормонов и их метаболитов, как например прегнадиола и эстрадиола. В последнее время доказано, что и билирубин выделяется в желчь в сопряженной форме с глюкуроновой кислотой (36).

В реакции, катализируемой β -глюкуронидазой, равновесие резко смещено в сторону гидролиза β -глюкуронатов, и значение этого фермента для синтеза этих соединений кажется маловероятным (108). На это указывает также тот факт, что сахаро-1,4-лактон, являющийся сильным ингибитором β -глюкуронидазы, не тормозит синтеза глюкуронатов (142). Синтез глюкуронатов,

вероятно, главным образом осуществляется через уридиндифосфоглюкуроновую кислоту и фермент глюкуронат-трансферазу (61).

β -глюкуронидаза широко распространена в животных тканях (64, 69, 189); ее физиологическое значение, вероятно, связано с катаболизмом мукополисахаридов. Наибольшую активность β -глюкуронидазы отмечают в почках, печени, селезенке, придатке яичка, а также в неоплазматических тканях (65, 66). Значительные активности встречаются также в лейкоцитах. В гомогенатах печени фермент почти полностью локализован в митохондриях и микросомах; во фракции растворимых белков цитоплазмы и в ядрах активность фермента ничтожна (199). Оптимум pH для β -глюкуронидазы животных тканей находится обычно между 4,0 и 5,0. Высокоочищенные препараты β -глюкуронидазы селезенки или печени быстро инактивируются в слабых растворах. Предохраняющее действие оказывают в таких случаях белки, например альбумины и протамины, а также ДНК.

Активность β -глюкуронидазы зависит от влияния гормонов. Ее уровень в матке мышей после удаления яичников значительно понижается; после введения эстрогенов он, наоборот, повышается (67). Активность фермента в периферической крови значительно повышается во время беременности, а после родов быстро возвращается к норме. Особенно высокие активности наблюдались у женщин, которые впоследствии заболевали эклампсией (119a). При помощи соответствующих доз стилбестрола удавалось удерживать повышенный во время беременности уровень β -глюкуронидазы также и в послеродовой период (68). Значительная ферментативная активность наблюдается в слизистой матки. Она повышается в течение первых двух третей менструального цикла, а потом снова понижается.

Для определения активности β -глюкуронидазы, в качестве субстрата употребляют преимущественно фенолфталеин-моно-глюкуронат, причем непосредственно в щелочной среде измеряют количество освобождаемого ферментом фенолфталеина (69, 189). Есть также методы, использующие ряд хромогенных соединений глюкуроновой кислоты (83).

Рост активности β -глюкуронидазы сыворотки наблюдался при болезнях печени (162), в известном проценте случаев злокачественных опухолей (83, 217). Активность β -глюкуронидазы в моче больных раком мочевого пузыря, по всей вероятности повышена, однако полностью это не подтвердилось (109). В большинстве проб мочи имеется ингибитор фермента (109). Активность β -глюкуронидазы обнаружена также в спинномозговой жидкости и в плевральных и брюшинных экссудатах. В случаях рака детородных органов содержание β -глюкуронидазы резко увеличивается во влагалищной жидкости, что следует отнести за счет значительного содержания фермента в неоплазматических клетках.

Определение активности β -глюкуронидазы по методу Fishman и сотр. (69). Метод состоит в прямом колориметрическом измерении в щелочной среде, количества фенолфталеина, освобожденного из субстрата (фенолфталеин-моно- β -глюкуронат). Субстрат получается путем биологического синтеза из мочи кроликов, которым впрыскивают фенолфталеин-фосфат. Приведенный ниже метод представляет собой модификацию метода Fishman, рекомендуемый Boyland и сотр. (34, 35).

Реактивы: 1) раствор субстрата: растворяют 0,05 г фенолфталеин-моно- β -глюкуроната в 10 мл этанола (свежедистиллированного над КОН) и разбавляют до объема 100 мл дистиллированной водой; 2) ацетатный буфер 0,2 М pH 4,5; 3) 10% раствор Na_2CO_3 .

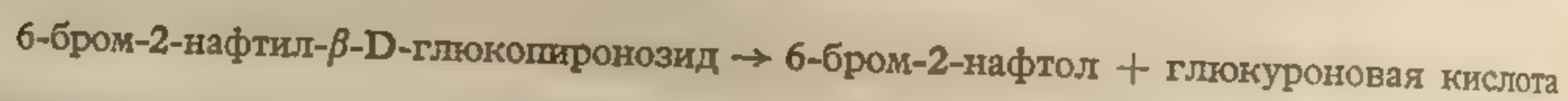
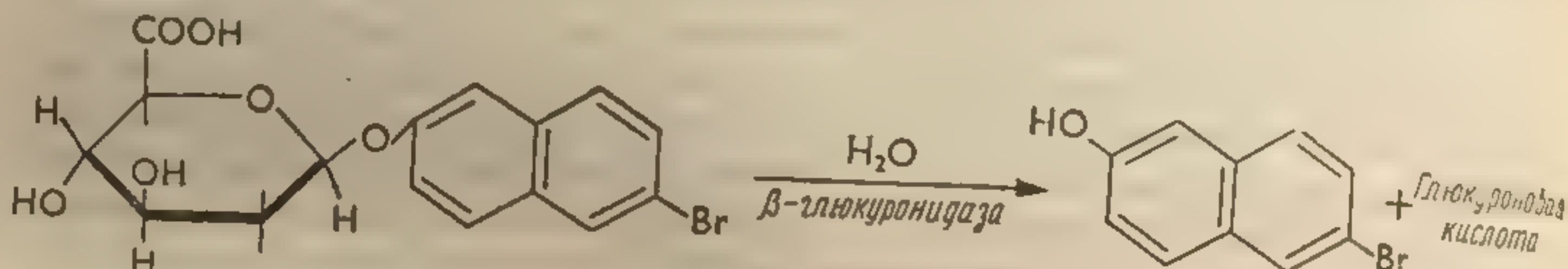
Определение активности в сыворотке (211). Плазму разбавляют, перед самым определением в десять раз; 1 мл субстрата, 1 мл ацетатного буфера и 1 мл разбавленной плазмы инкубируют в течение 16 часов, при температуре 37°. В то же время инкубируют холостую пробу без плазмы. Под конец инкубации к пробам добавляют 1 мл 10% Na_2CO_3 ,

а к холостой пробе — 1 мл разбавленной плазмы. Центрифугируют пробы при 3000 оборотов/мин. в продолжение 10 минут и колориметрируют при 550 мμ. Активность выражают в единицах. 1 единица = 1 μг фенолфталеина, освобожденного 1 мл плазмы в течение часа, в условиях опыта.

Определение активности в моче (34, 109). Суточную мочу собирают в посуду, содержащую 10 мл 20% раствора тимола в бензоле. Перед определением мочу центрифугируют в течение 15 минут при 450 g. 1 мл мочи, 1 мл субстрата и 1 мл ацетатного буфера инкубируют в течение 18 часов при температуре 37°. Инкубируют также холостую пробу, содержащую мочи. По истечении срока инкубации к пробам добавляют по 1 мл 10% Na₂CO₃, а к холостой пробе добавляют 1 мл мочи. Пробы центрифугируют в течение 15 минут при 600 g и отсчитывают показания при 550 мμ. Активность фермента в моче выражают в таких же единицах как и для сыворотки.

Активность в моче здоровых лиц колеблется от 0,05 до 1,2 ед./мл. Окрашивание фенолфталеина происходит в пределах pH 10,0—10,5; оно сохраняется в течение 2 часов. Максимум окрашивания появляется между 10,2 и 10,6. Оптимум pH для β-ГР в сыворотке и моче равняется 4,5.

Определение активности β-глюкуронидазы по методу Goldberg и сотр. (83). Ферментативная реакция протекает, при этом методе, соответственно приведенному ниже уравнению:



6-бром-2-нафтол определяют после предварительного превращения его в диазо-пигмент путем сопряжения со стабилизированным раствором диазотетраазониевой соли. Образующийся диазо-пигмент экстрагируют хлороформом и определяют количественно, пользуясь стандартной кривой, составленной по чистому 6-бром-2-нафтолу.

Реактивы: 1) раствор субстрата готовят, растворяя 50 мг субстрата (Dajac Laboratories, The Borden Company, Philadelphia, Pennsylvania) в 100 мл 2/3 M ацетатного буфера, pH 4,5. Раствор годен для употребления в течение 3 месяцев; 2) 0,3 M раствор третичного фосфата натрия; 3) ортодианизидин-тетраазоний: 1 мг соли растворяют перед самым употреблением в 1 мл холодной (0—10°) дистиллированной воды; 4) 80% трихлоруксусная кислота; 5) хлороформ.

Определение активности в моче. 50 мл мочи из суточной порции, без консервантов, диализуют в течение ночи против проточной воды. 1 мл диализата и 1 мл раствора субстрата инкубируют в течение 3 часов при температуре 50°. Из двух одновременно приготовленных контрольных проб одна содержит 1 мл субстрата и 1 мл H₂O, а вторая 1 мл диализата и 1 мл 2/3 M ацетатного буфера.

Через 3 часа прекращают ферментативную реакцию 1 мл третичного фосфата натрия, причем pH смеси повышается до 7,5—8,0, т.е. до оптимума для реакции освобожденного нафтола с ортодианизидин-тетраазонием, прибавляемым в количестве 1 мл. Эта реакция, дающая диазо-пигмент, заканчивается через 3 минуты при комнатной температуре. Затем добавляют 2 мл трихлоруксусной кислоты и экстрагируют пигмент 10 мл хлороформа. После центрифугирования в течение 5 минут при 2000 оборотов/мин. 5 мл хлороформного раствора наливают в кювету фотометра и отсчитывают показания при 560 мμ. Количество освобожденного нафтола находят по стандартной кривой, составляемой по растворам, содержащим от 10 до 100 μг 6-бром-2-нафтола, фотометрируемым в условиях опыта. Авторы принимают за единицу активности число мг 6-бром-2-нафтола, освобожденного суточной порцией мочи, в условиях опыта.

Определение активности в сыворотке. Авторы определяли активность в сыворотке, инкубируя 1 мл 5% раствора сыворотки в воде с 1 мл субстрата в течение 24 часов при температуре 50°. Дальнейший ход анализа такой же, как при определении активности фермента в моче. Мерой активности фермента было число μг 6-бром-2-нафтола, освобож-

денного при описанных условиях. Это число определялось по стандартной кривой, составляемой при помощи 6-бром-2-нафтола в присутствии сыворотки, для коррекции возможных потерь пигмента, связываемого белками сыворотки.

Оптимум pH при данном субстрате равнялся для фермента в моче 4,5, а в сыворотке 4,0. Фермент не теряет активности при температуре 50°, в течение 24 часов. Полная инактивация происходила при подогревании до температуры 100° в продолжение 1 минуты. Не обнаружено потерь активности при хранении проб в течение 7 дней при температуре от -20 до +10°. Скорость реакции была пропорциональна количеству взятой мочи и сыворотки, до гидролиза 15% субстрата. При более высоких активностях рекомендуют повторить определение с более разведенными пробами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abraham E. P., Robinson R.: Nature. 1937, 140, 24. — 2. Albaum H. G., Umbreit W. W.: J. Biol. Chem. 1947, 167, 369. — 3. Alderton G., Ward W. H., Fevold H. L.: J. Biol. Chem. 1945, 157, 43. — 4. Alderton G., Fevold H. L.: J. Biol. Chem. 1946, 164, 1. — 5. Amano T. и соавт.: Med. J. Osaka Univ. 1954, 4, 401. — 5a. Amelung D., Horn H. D., Schroeder E.: Klin. Wchsrf. 1958, 36, 963. — 6. Arend R., Orłowski M., Hulanicka K.: Pol. Tyg. Lek. 1959, 14, 345. — 7. Asboe-Hansen G.: Acta Endocrin. 1952, 9, 29. — 8. Ashwell G., Hickman: J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 5889. — 9. Axelrod B., Jang R.: Feder. Proc. 1953, 12, 172. — 10. Axelrod B., Jang R.: J. Biol. Chem. 1954, 209, 847. — 11. Axelrod B.: Methods in Enzymology. 1955, 1, 363. — 12. Baker R., Govan D.: Cancer Rec. 1953, 13, 141. — 13. Baranowski T.: Z. physiol. Chem. 1939, 260, 43. — 14. Baranowski T., Niederland T. R.: J. Biol. Chem. 1949, 180, 543. — 15. Baranowski T.: J. Biol. Chem. 1949, 180, 535. — 16. Beck W. S.: J. Biol. Chem. 1955, 212, 847. — 17. Beisenherz G., Boltze H. J., Bücher Th.: Z. Naturforsch. 1953, 8b, 555. — 18. Benzer P., Schaffer A. B.: Oral Surg. 1952, 5, 1315. — 19. Berenson G. I., Newman J. K., Mathews M. B., Dorfman A.: J. Lab. Clin. Med. 1954, 44, 767. — 20. Berger L. R., Weiser R. S.: Biochim. Bioph. Acta 1957, 26, 517. — 21. Berlepsch K.: Biochem. Z. 1958, 329, 542. — 22. Berlepsch K.: Biochem. Z. 1958, 331, 49. — 23. Bernfeld P.: Advances in Enzymol. 1951, 12, 379. — 24. Bernfeld P., Duckert F., Fischer E. H.: Helv. Chim. Acta. 1950, 33, 1064. — 25. Bing R. J., Castelanos A., Siegel A.: J. Am. Med. Ass. 1957, 164, 647. — 26. Blakley R. L.: Biochem. J. 1951, 49, 257. — 27. Bodansky O.: J. Biol. Chem. 1953, 202, 829. — 28. Bodansky O.: Cancer 1954, 7, 1200. — 29. Bodansky O.: Cancer 1954, 7, 1191. — 30. Bodansky O.: Cancer 1955, 8, 1087. — 31. Bodansky O.: Cancer 1957, 10, 859. — 32. Bodansky O.: Cancer 1957, 10, 865. — 33. Boyland E., McClean D.: J. Path. 1935, 41, 553. — 34. Boyland E., Wallace D. M., Williams D. C.: Brit. J. Cancer 1955, 9, 62. — 35. Boyland E., Gasson J. E., Williams D. C.: Brit. J. Cancer. 1957, 11, 120. — 36. Billing B. H., Cole P. G., Lathe G. H.: Biochem J. 1957, 65, 774. — 37. Brumfitt W., Wardlaw A. C., Park J. T.: Nature 1958, 181, 1783. — 38. Bruns F. H., Jacob W.: Klin. Wchsrf. 1954, 32, 1041. — 39. Bruns F. H., Hinsberg K.: Biochem. Z. 1954, 325, 532. — 40. Bruns F. H., Puls W.: Klin. Wchsrf. 1954, 32, 656. — 41. Bruns F. H.: Biochem. Z. 1954, 325, 156. — 42. Bruns F. H., Noltman E., Valhaus E.: Biochem. Z. 1958, 330, 483. — 43. Bruns F. H.: Biochem. Z. 1956, 327, 523. — 44. Bruns F. H., Dünwald E., Noltman E.: Biochem. Z. 1958, 330, 497. — 45. Bücher Th.: Biochim. Bioph. Acta 1947, 1, 292. — 46. Bücher Th.: Methods in Enzymology 1955, 1, 427. — 47. Bücher Th., Pfeleiderer G.: Methods in Enzymol. 1955, 1, 435. — 48. Burghartz N., Quenzer K.: Klin. Wchsrf. 1954, 32, 977. — 49. Burghartz N., Boosfeld E.: Klin. Wchsrf. 1954, 32, 182. — 50. Cabaud P. G., Wróblewski F.: Am. J. Clin. Path. 1958, 30, 234. — 51. Caraway W. T.: Am. J. Clin. Path. 1959, 32, 97. — 52. Cardini C. E., Paladini A. C., Caputto R., Leloir L. F., Trucco R. F.: Arch. Biochem. 1949, 22, 87. — 53. Chain E., Duthie E. S.: Nature 1939, 144, 977. — 54. Chojecki Z.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1956, 26, 1, 161, 319. — 54a. Cori G. T., Colowick S. P., Cori R. L., Granier M.: Yale J. Biol. Med. 1954, 16, 257. — 55. Cori G. T., Slein M. W., Cori C. F.: J. Biol. Chem. 1938, 124, 543. — 56. Cori G. T., Slein M. W., Cori C. F.: J. Biol. Chem. 1952, 194, 417. — 57. Dishe Z., Bo-1948, 173, 605. — 58. Dishe Z.: J. Biol. Chem. 1953, 204, 983. — 59. Dishe Z.: J. Biol. Chem. 1951, 192, 583. — 60. Duran-Reynals F.: J. Exp. Med. 1929, 50, 323. — 61. Dutton G. J., Storey I. D. E.: Biochem. J. 1954, 57, 275. — 62. Embden G., Giesbach W. Z.: physiol. Chem. 1914, 91, 251. — 63. Fischer E. H., Duckert F., Bernfeld P.: Helv. Chim. Acta. 1940, 136, 229. — 64. Fishman W. H.: J. Biol. Chem. 1939, 127, 367. — 65. Fishman W. H., Anlyan A. J. Science 1947, 106, 66. — 66. Fishman W. H., Kadson S. C., Hamburger F.: J. Am. Med. Ass. 1950, 143, 350. — 67. Fishman W. H., Fishman L. W.: J. Biol. Chem. 1944, 152, 487. — 68. Fishman W. H., Odell L. D., Gill J. E., Christensen R. A.: Am. J. Obstetr. Gynecol. 1950, 59, 414. — 69. Fishman W. H., Springer B., Brunetti R.: J. Biol. Chem. 1948, 173, 449. — 70. Flanagan P., Lionetti F.: Blood 1955, 10, 497. — 71. Fleming A.: Proc. Roy. Soc. B. 1922, 93, 306. — 72. Fraenkel-Conrat H.: Arch. Biochem.

- Bioph. 1950, 27, 109. — 73. *Freeman M. E.*: Clin. Chim. Acta 1961, 6, 300. — 74. *Friou G. J.*: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1950, 52, 1112. — 75. *Garbiński T., Nowalany J.*: Pol. Tyg. Lek. 1954, 9, 530. — 76. *Gerlach U.*: Klin. Wchsrf. 1957, 35, 1144. — 77. *Gerlach U.*: Klin Wchsrf. 1959, 37, 93. — 78. *Gibian H.*: Z. physiol. Chem. 1951, 289, 1; 1952, 291, 6; 1955, 300, 261. — 79. *Glick R., Moore R. H.*: Arch. Biochem. 1948, 19, 174. — 80. *Glogner P.*: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 573.
81. *Gray S. J., Reifenstein R. W., Connolly E. P., Spiro H. M., Young J. C. G.*: Gastroenterology 1950, 16, 687. — 82. *Green D. E.*: Biochem. J. 1936, 30, 629. — 82a. *Guerra F.*: J. Pharmacol. Exp. Therap. 1946, 87, 193. — 83. *Goldbarg J. A., Pineda E. P., Banks B. M., Rutenburg A. M.*: Gastroenterology 1959, 36, 202. — 84. *Hamburger F.*: Yale J. Biol. Med. 1954, 17, 479. — 85. *Harris T. N.*: J. Exp. Med. 1948, 87, 41, 57. — 86. *Harris T. N., Harris S.*: Am. J. Med. Sci. 1949, 217, 174. — 87. *Hartmann F., Matijevic G.*: Z. Rheumaforsch. 1952, 11, 23. — 88. *Hartwig W.*: Pol. Arch. Med. Wewn. 1948, 18, 160. — 89. *Hers H. G.* и соавт.: Bull. Soc. Chim. Biol. 1951, 33, 21. — 90. *Hess B., Gehm E.*: Klin. Wchsrf. 1955, 33, 91. — 90a. *Hess B., Walter S. J.*: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 214.
91. *Hill B. R.*: Cancer Res. 1956, 16, 460. — 92. *Horecker B. L., Smyrniotis P. Z., Seegmiller J. E.*: J. Biol. Chem. 1951, 193, 383. — 93. *Jacob W., Neuhaus J.*: Klin. Wchsrf. 1954, 32, 923. — 94. *Januszkiewicz J.*: Pol. Tyg. Lek. 1956, 11, 2017. — 95. *Januszkiewicz J.*: Pol. Tyg. Lek. 1959, 14, 213. — 96. *Jensen C. E.*: Acta Chem. Scand. 1949, 3, 584. — 97. *Joerg M., Ertl W.*: Wien. Med. Wchsrf. 1953, 103, 35. — 98. *Jolles, Bernier J., Jauregui J., Jolles P.*: Compt. rend. acad. Sci. 1960, 250, 413. — 99. *King E. J., Campbell D.*: Clin. Chim. Acta. 1961, 6, 301. — 100. *Kornberg A., Horecker B. L.*: Methods in Enzymol. 1955, 1, 323.
101. *Kozo Inoue* и соавт.: *Bikens J.* 1959, 2, 1. — 102. *Krawczyński J.*: Postępy Biochemii 1959, 5, 87. — 103. *Krzyżaniak J.*: Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 676. — 104. *Laschtschenko P.*: Z. ges. Hyg. 1909, 64, 419. — 105. *Leuchs E. F.*: Poggendorfs Ann. Phys. u. Chem. 1831, 22, 623. — 106. *Leuthardt F., Testa E., Wolf H. P.*: Helv. Chim. Acta. 1953, 36, 227. — 107. *Leviton C. A.*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948, 68, 566. — 108. *Levy G. A., Marsh C. A.*: Advances in Carbohydrate Chem. 1959, 14, 381. — 109. *Lewis F. J. W., Plaice C. H. J.*: Brit. J. Cancer. 1960, 14, 106. — 110. *Lohmann K.*: Biochem. Z. 1933, 262, 137.
111. *Lohmann K., Meyerhof O.*: Biochem. Z. 1934, 273, 60. — 112. *Lathe G. H., Walker M.*: Biochem. J. 1958, 70, 705. — 113. *Marchionini A., Oltenstein B.*: Klin. Wchsrf. 1932, 12, 1345, 1424. — 114. *Magendie M.*: Compt. rend. acad. sci. 1846, 23, 189. — 115. *Markert C. L., Moller F.*: Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 1959, 45, 753. — 116. *Mayer R. L., Kull F. C.*: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1947, 66, 392. — 117. *McClellan, Hale C. W.*: Biochem. J. 1941, 35, 159. — 118. *McClellan D., Rowlands J. W.*: Nature 1942, 150, 627. — 119. *McCoy E. E., Najjar V. A.*: J. Biol. Chem. 1959, 234, 3017. — 119a. *McDonald D. F., Odell L. D.*: J. Clin. Endocrinol. 1947, 7, 535. — 120. *Mejbaum W.*: Z. physiol. Chem. 1939, 258, 117.
121. *Menkin V.*: Amer. J. Physiol. 1940, 129, 691. — 122. *Merten R., Solbach H. G.*: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 222. — 123. *Metzger M., Hardy P. H. Jr., Nell E. E.*: Am. J. Hyg. 1961, 73, 236. — 124. *Metzger M.*: Arch. Imm. Ter. Dośw. 1961, 9, 000. — 125. *Metzger M.*: Arch. Imm., Ter. Dośw. 1962, 10, 00. — 126. *Meyer-Arendt E., Beisenherz G., Bücher Th.*: Naturwiss. 1953, 2, 59. — 127. *Meyerhof O., Lohmann K.*: Biochem. Z. 1934, 271, 89. — 128. *Meyerhof O.* и соавт.: Biochem. Z. 1936, 286, 301, 319. — 129. *Meyerhof O., Kiessling W.*: Biochem. Z. 1935, 279, 40. — 130. *Meyerhof O., Schulz W.*: Biochem. Z. 1938, 297, 60.
131. *Meyerhof O., Kiessling W.*: Naturwiss. 1934, 22, 838. — 132. *Meyerhof O., Kiessling W.*: Biochem. Z. 1935, 276, 239. — 133. *Meyer K. H., Fischer E. H., Staub A., Bernfeld P.*: Helv. Chim. Acta 1948, 31, 2158. — 134. *Meyer K. H., Fuld, Bernfeld P.*: Exper. 1947, 3, 411. — 135. *Meyer K. H., Gellhorn H., Prudden J. F., Lehman W. L., Steinberg A.*: Am. J. Med. 1948, 5, 496. — 136. *Meyer K.* и соавт.: Am. J. Med. 1948, 5, 482. — 137. *Meyer K., Dubos R., Smyth E. M.*: J. Biol. Chem. 1937, 118, 71. — 138. *Meyer K., Hobby G. L., Chaffee E., Dawson M. H.*: J. Exp. Med. 1940, 71, 137. — 139. *Morawiecki A.*: Acta Biochem. Polon. 1958, 5, 437. — 140. *Morawiecki A.*: Arch. Imm., Ter. Dośw. 1960, 8, 243.
141. *Muus J.*: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg ser. chim. 1953, 28, 317. — 142. *Najjar V. A., Pullman M. E.*: Science 1954, 119, 630. — 143. *Negelein E., Bromel H.*: Biochem. Z. 1939, 303, 132. — 144. *Neilands J. B.*: J. Biol. Chem. 1952, 199, 373. — 145. *Neilands J. B.*: Science 1952, 115, 143. — 146. *Niselbaum J. S., Bodansky O.*: J. Biol. Chem. 1959, 234, 3276. — 147. *Niselbaum J. S., Bodansky O.*: J. Biol. Chem. 1961, 236, 401. — 148. *Niselbaum J. S., Bodansky O.*: J. Biol. Chem. 1961, 236, 401. — 149. *Noltmann E., Bruns F. H.*: Z. physiol. Chem. 1958, 313, 194. — 150. *Orłowski M.*: Pol. Tyg. Lek. 1958, 13, 1421.
151. *Orłowski M.*: J. Biol. Chem. 1959, 234, 1651. — 152. *Orłowski M.*: Pol. Tyg. Lek. 1958, 13, 851. — 153. *Orłowski M.*: Wiad. Lek. Nr 11—12, 555, 1958. — 154. *Paladini A. C.* и соавт.: Arch. Biochem. 1949, 23, 55. — 155. *Pantlitschko M., Kaiser E.*: Biochem. Z. 1951, 322, 137. — 156. *Parnas J. K., Ostern P., Mann T.*: Biochem. Z. 1934, 272, 64. — 157. *Parr C. W.*: Nature 1956, 178, 1401. — 158. *Pedich W.*: Pol. Tyg. Lek. 1955, 10, 845. — 159. *Pfleiderer G., Jeckel D.*: Biochem. Z. 1957, 329, 370. — 160. *Pfleiderer G., Wachsmuth E. D.*: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 352.

161. Plagemann P. G. W., Gregory K. F., Wróblewski F.: J. Biol. Chem. 1960, 235, 2282. —
162. Pineda E. G., Goldbarg J. A., Banks B. M., Rutenburg A. M.: Gastroenterology 1959, 36, 202. — 163. Quinn R. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 1950, 52, 1118. — 164. Rafalowicz A., Muller J., Soldaj H., Wolańska A.: Pol. Tyg. Lek. 1959, 14, 4. — 165. Rapport M. M., Meyer K., Linker A.: J. Biol. Chem. 1950, 186, 615. — 165a. Ratliff R. K.: J. Am. Med. Ass. 1954, 155, 746. — 166. Richterich R., Gautier E., Egli W., Zuppinger K., Rossi E.: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 346. — 167. Richterich R., Schafroth P., Colombo J. P., Tempereli F.: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 987. — 168. Roe J. H.: J. Biol. Chem. 1934, 107, 15. — 169. Sanuella L. S.: Yale J. Biol. 1940, 12, 433. — 170. Schmidt E., Schmidt F. W., Wildhirt E.: Klin. Wchsrf. 1958, 36, 280, 172. — 171. Schon H., Wüst H.: Klin. Wchsrf. 1960, 38, 497. — 172. Seegmiller J. E., Horecker B. L.: J. Biol. Chem. 1952, 194, 261. — 173. Seifter J., Warren G. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 74, 796. — 174. Sibley J. A., Lehninger A. L.: J. Biol. Chem. 1949, 177, 859. — 175. Sibley J. A., Lehninger A. L.: J. Nat. Canc. Inst. 1949, 9, 303. — 176. Sidbury J. B. и соавт.: J. Biol. Chem. 1956, 222, 89. — 177. Siegel A., Bing R. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956, 91, 604. — 178. Skanse B., Sundblad L.: Acta physiol. Scand. 1943, 6, 37. — 179. Somers G. F. и соавт.: Arch. Biochem. 1945, 6, 295. — 180. Sterkowicz S.: Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 1884. — 181. Straub F. O.: Biochem. J. 1940, 34, 483. — 182. Street H. V.: Biochem. J. 1960, 76, 10. — 183. Stumpf P. K., Horecker B. L.: J. Biol. Chem. 1956, 218, 753. — 184. Sumner J. B., Howell S. F.: J. Biol. Chem. 1935, 108, 51. — 185. Sumner J. B.: J. Biol. Chem. 1924—25, 62, 287. — 186. Sutherland E. W., Posternack T. z., Cori C. F.: J. Biol. Chem. 1949, 179, 501. — 187. Sutherland E. W., Posternack T. z. i Cori C. F.: J. Biol. Chem. 1949, 181, 153. — 188. Suzuki S.: Arch. Hyg. 1911, 74, 345. — 189. Talalay P., Fishman W. H., Huggins C.: J. Biol. Chem. 1946, 166, 757. — 190. Tallan H. H., Stein W. H.: J. Biol. Chem. 1953, 200, 507. — 191. Tanko B.: Biochem. J. 1936, 30, 692. — 192. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.: Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism. Minneapolis 1945. — 193. Van Loon E. J. и соавт.: Am. J. Clin. Path. 1952, 22, 1134. — 194. Van Rey W., Finckh R.: Klin. Wchsrf. 1957, 35, 540. — 195. Van Rymenant M., Robert J.: Cancer 1951, 12, 1087. — 196. Vesell E. S., Bearn A. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957, 94, 96. — 197. Vesell E. S., Bearn A. G.: J. Clin. Invest. 1961, 40, 586. — 198. Volk B. W., Losner S., Aronson S. M., Lew H.: Am. J. Med. Sci. 1956, 232, 38. — 199. Walker P. G.: Biochem J. 1952, 51, 223. — 200. Warburg O.: Biochem. Z. 1923, 142, 317. — 201. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z. 1931, 242, 206. — 202. Warburg O., Christian W., Griese A.: Biochem. Z. 1935, 282, 157. — 203. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z. 1939, 303, 40. — 204. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z. 1941, 310, 384. — 205. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z. 1942, 310, 389. — 206. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z. 1939, 301, 221. — 207. Warburg O., Christian W.: Naturwiss. 1942, 731. — 208. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z. 1943, 314, 149. — 209. Watson E. M., Pierce R. H.: Brit. J. Dermatol. 1947, 59, 327. — 210. Weissmann B., Meyer K., Sampson P., Linker A.: J. Biol. Chem. 1954, 208, 417. — 211. Whitaker B. L.: Brit. J. Cancer 1960, 14, 471. — 212. Wieland Th., Pfeleiderer G.: Biochem. Z. 1957, 329, 112. — 213. Wieland Th., Pfeleiderer G., Ortanderl F.: Biochem. Z. 1959, 331, 103. — 214. Wieland Th., Pfeleiderer G., Haupt J., Wörner W.: Biochem. Z. 1959, 332, 1. — 215. Wohlge-muth J.: Biochem. Z. 1908, 9, 1. — 216. Wolf H. P., Forster G., Leuthardt F.: Gastroenterologia 1957, 87, 172. — 217. Wolfson S. K., Williams-Ashman H. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957, 96, 231. — 218. Wörner W., Martin H.: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 368. — 219. Wróblewski F., La Due J. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955, 90, 210. — 220. Zablocki B.: Post. Hig. Med. Dośw. 1953, 7, 30. — 221. Zablocki B.: Post. Hig. Med. Dośw. 1960, 14, 463. — 222. Zimmerman H. J., Weistein H. G.: J. Lab. Clin. Med. 1956, 48, 607.

Руководства

1. Mohler A. H.: Introduction to Enzymology. Academic Press INC., Publishers New York 1957. — 2. Ammon R., Dirscherl W.: Fermente. Band I. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. 1959. — 3. Hoffmann-Ostenhof O.: Enzymologie. Wien. Springer Verlag 1954—4. Abderhalden R.: Klinische Enzymologie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart 1958. — 5. Colowick S. P., Kaplan N. O.: Editors. Methods in Enzymology Academic Press, New York 1955, T. 1—4. — 6. Hoppe-Seyler: Thierfelder. Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch — Chemischen Analyse. T. V. Untersuchung der Organe Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen. Springer Verlag. Berlin — Göttingen — Heidelberg 1953. — 7. Boyer P. D., Lardy H., Myrback K.: The Enzymes. Vol 4. Academic Press. New York and London 1960. — 8. Neilands J. B., Stumpf P. K.: Outlines of Enzyme Chemistry. John Wiley and Sons INC. New York 1958. — 9. Richterich R.: Enzym-pathologie. Springer Verlag. Berlin — Göttingen — Heidelberg 1958. — 10. Fruton J. S.: Simmonds S. General Biochemistry. John Wiley and Sons. INC. New York 1958.

ФЕРМЕНТЫ ЦИКЛА ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ (ЦИКЛА КРЕБСА)

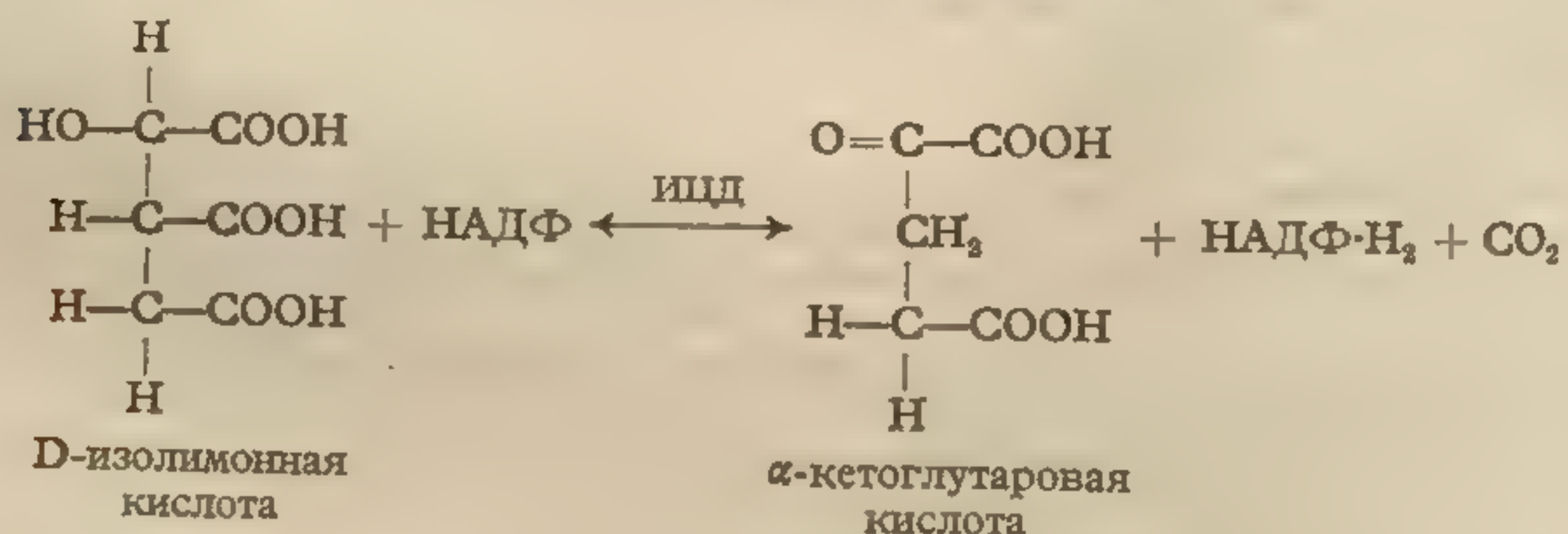
MARIAN ORŁOWSKI

Ферменты цикла Кребса катализируют целый ряд реакций, в ходе которых происходит окисление молекул ацетата в CO_2 и воду. В этом цикле могут подвергаться окислению продукты метаболизма углеводов, жиров и аминокислот. Энергия, освобождаемая этими реакциями, накапливается в виде высокоэнергетических химических связей. Большинство ферментов цикла Кребса локализовано в митохондриях, однако, по-видимому, значительная часть изоцитратдегидрогеназы и малатдегидрогеназы, а также и аконитазы находится во фракции растворимых белков цитоплазмы.

Из ферментов, катализирующих реакции цикла лимонной кислоты, в сыворотке были обнаружены малат- и изоцитратдегидрогеназа. Аконитаза не была найдена в сыворотке, даже в патологических состояниях (3). Точно также в сыворотке отсутствует, или встречается в самом незначительном количестве активность фумаразы, „malic enzyme“ и сукцинатдегидрогеназы (7).

ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗА (ИЦД)

Окисление цитратов катализируется ферментом, находящимся в зависимости от НАДФ (1, 8). В реакции, катализируемой ИЦД, одновременно происходит окисление и декарбоксилирование соединения в α -кетоглутаровую кислоту. В определенных условиях, реакция декарбоксилирования обратима и может служить для включения CO_2 в органические соединения.



Промежуточным продуктом этой реакции является, вероятно, щавелевоуксусная кислота. Для активности фермента необходимо присутствие ионов двухвалентных металлов, из коих наиболее активным является Mn^{++} .

Описана также ИЦД с НАД вместо НАДФ в качестве кофермента.

ИЦД находится в сыворотке (17). Повышение активности ИЦД наблюдается при эпидемическом гепатите (12), при закупорке желчных путей и неоплазматических метастазах в печени (9). Рост активности ИЦД отмечается также после инфаркта миокарда. Освобождение ИЦД из некротического миокарда происходит быстрее, чем освобождение лактатдегидрогеназы. Увеличение активности ИЦД после инфаркта миокарда кратковременно — оно проходит через 24 часа. Это связано, по всей вероятности, с краткостью периода освобождения фермента из некротической мышцы и его быстрой элиминацией из организма (13).

Эритроциты содержат в 86 раз больше фермента, чем сыворотка, а тромбоциты даже в 697 раз больше, чем сыворотка (9).

Определение активности ИЦД по Wolfson и Williams-Ashman (17). Принцип метода состоит в измерении скорости роста экстинкции $\text{НАДФ}\cdot\text{H}_2$.

при 340 мμ в системе, содержащей, кроме этого кофермента, DL-изоцитрат, буфер и ионы M^{++} .

Состав инкубационной смеси: 0,5 мл буфера Tris, 0,1 M, pH 7,5; 0,2 мл 0,001 M НАДФ, растворенного в 0,15 M NaCl; 0,3 мл 0,01 M $MnCl_2$; 0,05 мл 0,1 M DL-изоцитрата натрия. Контрольная проба содержит вместо изоцитрата такое же количество физиологического раствора поваренной соли. Температура опыта 25°. Реакцию пускают в ход, добавляя 0,5 мл сыворотки и тщательно перемешивая. Отсчеты производят каждые 2—5 минут, в продолжение 12—30 минут. При высоких активностях сыворотку предварительно разбавляют.

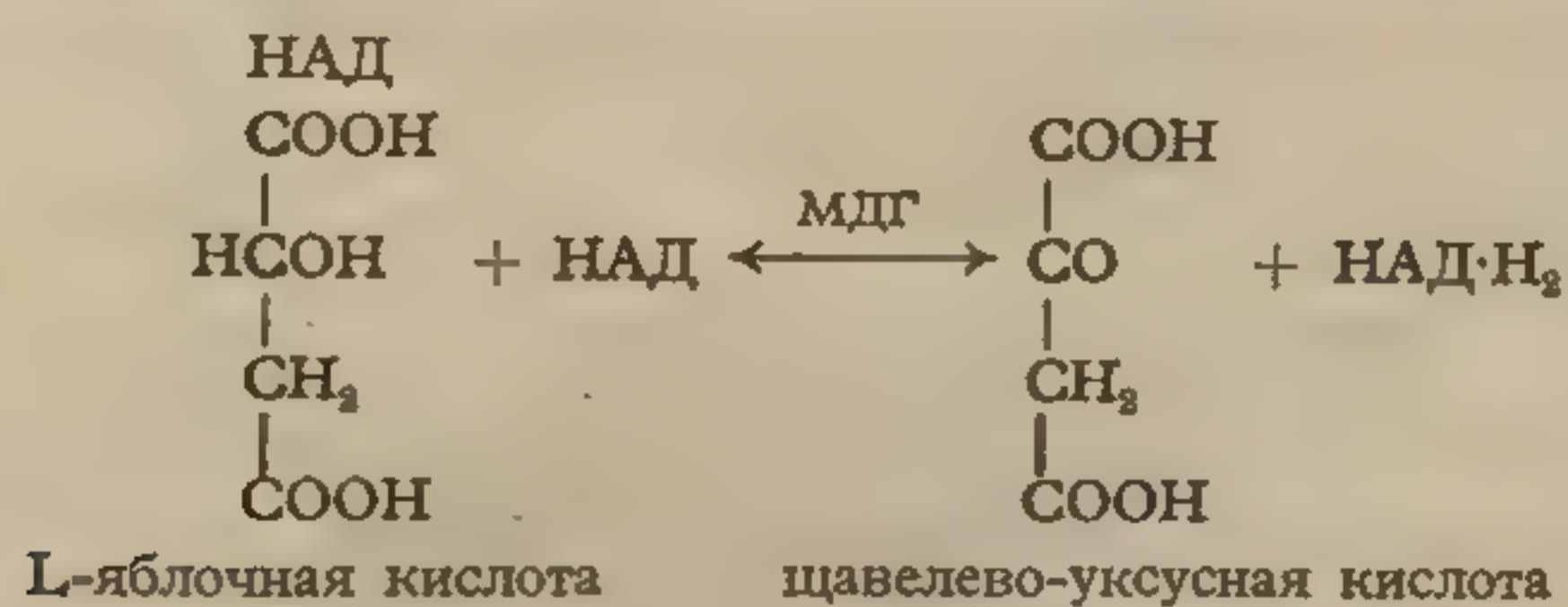
Для расчета активности пользуются частью кривой с кинетикой нулевого ряда. Ее выражают в μмолях образующегося НАДФ·Н₂ на 1 мл сыворотки в 1 час, в условиях опыта. Если определение производится при другой температуре, то необходимо сделать поправку на температуру, причем от 20° до 30° температурный коэффициент Q_{10} равняется 1,7. В отсутствии ионов Mn^{++} в среде активность ИЦД весьма невелика. Активность не изменяется при условии хранения сыворотки в течение нескольких часов при комнатной температуре, или нескольких дней при температуре 4°.

У здоровых лиц активность равнялась в среднем 110 ± 49 единиц (55—224). Нет существенной разницы между активностью у женщин и мужчин. Не было замечено зависимости между активностью фермента и возрастом, расой или концентрацией белков в сыворотке. Сыворотка, взятая из пуповины новорожденных, показала более высокую активность ИЦД (305 единиц) чем у взрослых. При повторных определениях ИЦД у одного и того же лица фермент обнаруживает довольно постоянную активность.

В спинномозговой жидкости также была обнаружена ИЦД, и был описан метод определения ее активности (15). Повышение активности ИЦД в спинномозговой жидкости констатировалось в ряде случаев новообразований центральной нервной системы.

МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА (МДГ)

Этот фермент катализирует обратимую реакцию окисления яблочной кислоты в щавелево-уксусную кислоту, причем коферментом служит НАД.



При нейтральном pH равновесие реакции смещено в сторону образования малата. При щелочном pH (около pH 10) окисление малата протекает весьма успешно.

МДГ встречается во всех тканях. Значительное количество фермента находится в мышце сердца, печени, скелетных мышцах, мозгу и почках. Впервые фермент был изолирован Straub из сердечной мышцы свиньи (14). Согласно новейшим открытиям Bücher и сотр. (5), в клетках находятся две малаатдегидрогеназы. Одна из них локализована в митохондриях, вторая в цитоплазме. Соотношение активностей обеих МДГ в разных органах неодинаково. В мышце сердца почти 100% фермента, по мнению авторов, находится в цитоплазме. Значительная активность МДГ обнаружена в цитоплазме печеночных клеток, в скелетных мышцах и мозгу. Активность МДГ увеличивается в сы-

воротке уже через несколько часов после инфаркта миокарда, достигает максимума через 2—3 дня и понижается, начиная с 6 дня (4, 6, 11, 16). Резкое повышение активности фермента в сыворотке наблюдалось при эпидемическом гепатите. Рост активности МДГ имеет место также при лейкозах, лимфогрануломатозе, гипертиреозе, интоксикациях и др.

Определение активности МДГ в сыворотке (1). Принцип метода состоит в измерении падения $E_{\text{НАД}\cdot\text{H}_2}$ при 340 м μ в системе, содержащей буфер, щавелево-уксусную кислоту и фермент.

К 0,1 или 0,05 мл сыворотки прибавляют 2 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,55 и 0,1 мл $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ (2,5 мг/мл). Доводят водой до объема 3 мл. Через 10—15 минут добавляют 0,1 мл 0,5 М раствора щавелево-уксусной кислоты (Sigma) в 0,1 М фосфатном буфере с рН 7,0. Определяют E_{340} несколько раз, с интервалами в 30 секунд. Щавелево-уксусную кислоту растворяют перед самым опытом в холодной воде, в пробирке с притертой пробкой. Декарбоксилирование щавелево-уксусной кислоты приводит к образованию пировиноградной кислоты, что в свою очередь, в условиях метода, дает толчок реакции катализируемой имеющейся в сыворотке лактатдегидрогеназой. Это может привести к серьезным ошибкам в методе.

У здоровых лиц активность МДГ составляла в среднем 79 единиц Wróblewski (50—104).

Amelung (2) определял активность МДГ сыворотки в следующей системе: 2,6 мл буфера Tris 0,1 М с рН 7,4; 0,1 мл $\text{НАД}\cdot\text{H}_2$ (8 мг 63%), препарата в 1 мл воды), 0,2 мл сыворотки, разбавленной 1 : 5. Реакцию пускают в ход, добавляя 0,1 мл раствора оксалоацетата 0,005 М. Измеряют скорость уменьшения E при 340 м μ . По E. Schmidt и сотр. активность МДГ у здоровых лиц составляет в среднем 2,05 единицы Bücher на мл сыворотки (1,05—2,63) (10).

ЛИТЕРАТУРА

1. Adler E., Von Euler H., Gunther G., Plass M.: Biochem. J. 1939, 33, 1028. — 2. Amelung D., Horn H. D., Schröder E.: Klin. Wchsrf. 1958, 36, 963. — 3. Beutler E., Yeh M. K. Y.: J. Lab. Clin. Med. 1959, 54, 456. — 4. Bing R. J., Castellanos A., Siegel A.: J. Am. Med. Ass. 1957, 164, 647. — 5. Delbrück A., Schimassek H., Bartsch K., Bücher Th.: Biochem. Z. 1959, 331, 297. — 6. Hess B., Raftopoulos R.: Dtsch. Arch. Klin. Med. 1957, 204, 97. — 7. Merten R., Solbach H. G.: Klin. Wchsrf. 39, 222, 1961. — 8. Ochoa S.: J. Biol. Chem. 1948, 174, 133. — 9. Okumura M., Spellberg M. A.: Gastroenterology 1960, 39, 305. — 10. Schmidt E., Schmidt F. W., Wildhirt E.: Klin. Wchsrf. 1958, 36, 280. — 11. Siegel A., Bing R. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956, 91, 604. — 12. Sterkel R. L., Spencer J. A., Wolfson S. K. Jr., Williams-Ashman H. G.: J. Lab. Clin. Med. 1958, 176. — 13. Strandjord P. E., Thomas K. E., White L. P.: J. Clin. Invest. 1959, 38, 2111. — 14. Straub F. B.: Z. physiol. Chem. 1942, 275, 63. — 15. Van Rymenant M., Robert J.: Cancer 1960, 13, 878. — 16. Wacker W. E. C., Ulmer D. D., Valee B. J.: New England J. Med. 1956, 225, 449. — 17. Wolfson S. K., Williams-Ashman H. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957, 96, 231.

ФЕРМЕНТЫ БЕЛКОВОГО И АМИНОКИСЛОТНОГО ОБМЕНА

KORNEL GIBIŃSKI

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Протеолитические ферменты принадлежат к наиболее распространенным. Они находятся в каждой клетке, в биологических жидкостях и секрете желез. Можно сказать, что везде, где встречается белок, имеется возможность его реконструкции. Белок представляет собой главный структурный компонент клеточной массы, а протеолитические ферменты играют главную роль в таких

важнейших жизненных процессах, как пищеварение, свертывание крови, гуморальная защита и т.д. (17). Факт активации неактивных предшественников ферментов путем разрыва пептидных цепей с отделением или без отделения свободных пептидов (4) означает, что протеолитическая активность является весьма существенным фактором мобилизации других ферментов, которые в свою очередь могут атаковать другие молекулы белка. Иногда возникают целые цепи реакций, в которых одна молекула белка (ферменты также являются белками), войдя в соприкосновение с другой, изменяет структуру последней и заодно ее активирует, вторая, в свою очередь изменяет третью и т.д. Примером такой цепной реакции может служить процесс свертывания крови. Это явление активирования путем протеолиза проявляется не только у протеолитических, но и у других ферментов. Итак смело можно сказать, что протеолиз принадлежит к наиболее важным ферментативным активностям организма. Это процесс еще недостаточно изучен, как целое. Мало известно об участии протеолитических процессов в патогенезе разных болезней; протеолитические ферменты лишь в незначительной степени используются в диагностике, а наше умение управлять ими минимально.

Причинами затруднений в этой области, вероятно, являются: а) обилие протеолитических ферментов в биологическом материале, б) их неспецифическое действие, наряду с весьма интенсивным влиянием на специфический субстрат, и в) разнообразие типов этого действия. Последняя из упомянутых причин порождает трудности номенклатурного и классификационного порядка.

Первоначальная классификация с разделением по органам, на желудочный пепсин, панкреатический трипсин, кишечный эрипсин и интрацеллюлярный катепсин в скором времени оказалась несостоятельной. Следующая классификация разделила протеолитические ферменты на группу действующих на высокомолекулярные белки и на ферменты, разлагающие пептиды. Первые называли протеиназами, вторым присвоили название пептидаза; обе группы, вместе взятые, были названы протеазами (7). Однако, в скором времени оказалось, что протеиназы, которые должны были разлагать только цельные белки, способны катализировать также разложение некоторых низкомолекулярных пептидов, что поколебало классификацию (3). Следующая классификация была построена на принципе гомо- или гетероспецифичности по отношению к субстрату. Оказалось, что гомоспецифичностью обладают пепсин, трипсин и катепсин, т.е. ферменты, дифференцируемые в чистом виде. Было предложено понятие протеаз, гидролизующих белок от конца пептидной цепи — экзопептидазы, и таких, которые начинают реакцию от центра молекулы белка — эндопептидазы, независимо от величины разлагаемой молекулы. По многим соображениям, в широких пределах, экзопептидазы совпадают с пептидазами, а эндопептидазы с протеиназами (1). Конечно, понятие эндопептидазы не имеет ничего общего с эндогенной протеиназой. Последняя означает интрацеллюлярный протеолитический фермент, например катепсин.

Очередная классификация (8) пептидаз придерживается структурных свойств пептидной цепи в месте действия фермента (карбоксипептидазы, аминоксипептидазы). Пространственную конфигурацию данного фермента можно изучать при помощи синтетических пептидов. Один и тот же протеолитический фермент может расщеплять и другие связи, например эфирный или гидразидные, при условии подобной пространственной структуры, что свидетельствует о зависимости действия фермента от локальной конфигурации.

Этот тип классификации неприменим к эндопептидазам (протеиназам), для определения которых мы вынуждены по-прежнему пользоваться традиционными названиями, как пепсин, трипсин и т.д.

ПЕПСИН

Пепсин давно известен как главный пищеварительный фермент желудка. Его неактивный предшественник пепсиноген выделяется главными клетками желудочных желез и, в кислой среде, ниже рН 6, начинает аутокатализировать свое превращение в активный пепсин, причем разрываются 9 пептидных связей. Пепсин получен в кристаллической форме. Помимо аминокислот, он содержит атом фосфора. Молекулярная масса пепсина равна 34000, масса пепсиногена — 42000. При электрофорезе он движется к аноду даже при рН 1,0. Оптимум действия пепсина находится при рН 1,5—2. Один грамм кристаллического пепсина в состоянии в течение 2 часов разложить 50 кг яичного альбумина, створожить 100000 л молока или растворить 2000 л желатины. Однако, он атакует не все белки — например муцин, кератин волос или протамин им не разлагаются. Испытания на синтетических пептидах показали, что пептидная связь, уязвимая для пепсина, обязательно содержит молекулу ароматической аминокислоты. Оказалось однако, что это условие может быть необязательным в случае длинной цепи полипептидов. Кроме того, пепсин разлагает простые пептиды с наибольшей скоростью при более высоком рН (около 4). Итак, один и тот же фермент выступает один раз в роли типичной пептидазы и атакует в определенных условиях определенный тип дипептида, а в другой раз, в других условиях и в другой точке приложения расщепляет молекулу цельного белка.

Этот пример ясно показывает, что все попытки заключить живые и постоянно реагирующие друг с другом белки в жесткие рамки искусственной классификации не выдерживают критики.

Ферменты типа пепсина (гомоспецифические) находятся также и в других тканях, в первую очередь в селезенке, почке и печени. Они носят название катепсинов А. Их общим признаком является то, что они проявляют пепсиноподобное действие при рН 3,5—5, т.е. в такой среде, в которой каталитическое действие пепсина по отношению к молекуле цельного белка ничтожно. Катепсин производится также слизистой желудка и находится в желудочном соку. Этот факт имеет особое значение, по-видимому, у новорожденных. Посмертный аутолиз осуществляется именно этим ферментом.

Новейшие исследования несколько запутывают этот вопрос. Оказывается, что желудок кроме пепсина, производимого железами дна выделяет псевдопепсин, происходящий из желез области привратника (19). Пепсин и псевдопепсин различают при электрофорезе, хроматографии и при высаливании, что указывает на разницу в их химическом строении, но у них общий оптимум действия при рН 2. Неудивительно, что некоторые авторы, учитывая возможность существования более чем одного типа пепсина и упомянутые свойства двойного оптимума рН для разных субстратов, считают, что катепсин как отдельный фермент вообще не существует, тем более, что до сих пор удалось получить пепсин, свободный от следов катепсина, но не было получено катепсина без пепсина. Различная реакция молекул пепсина и псевдопепсина или катепсина на те или другие физические методы разделения не может в настоящее время считаться основанием для дифференцирования, когда изомия стала общеизвестным фактом. Протеолитические ферменты этого типа, содержащиеся в клетках разных органов, проникают наружу и в кровь при разных механических или токсических повреждениях, некротизирующих клетки, подобно тому, как выходят трансаминазы, альдолазы, дегидрогеназы и др. Из-за своего распространения в органах, эти ферменты не нашли широкого применения в ферментативно-плазматической диагностике поражения тканей.

Пепсин
вано и кри
богатый а
4—6, т.е.
пептидазы
медленно
тепсина. О

Небольш
попадают
и отсюда
зывается
при одина
следнее не
веса.

Определ
стоящее в
вестен 90
стали инте
приводим

Опреде
дификаци
пепсином
ходящий и

Реактив
доводят дис
2) 2 Н НС
3) 0,2% в
4) молочн

воды, добав
Проведен
часы, во избе
мочи, набира
тора. Подогр
перепосят в
рованной мо
воды и 1 мл а
ва перемещи
казеина.

Результат

т — время
Мочу, взя
каплями тол
для трипсина
приготавли
добавления т

Трипсин
ческие фер
ческие) вст
они не спел
псином В
в настоящее
одинакова,
и по абсорб

13 — Клиниче

Пепсин имеет свой естественный ингибитор. Это вещество было изолировано и кристаллизовано. Это полипептид с молекулярной массой 6000—8000, богатый аргинином. Его тормозящее действие развивается в пределах pH 4—6, т.е. приблизительно в таких условиях, в которых пепсин проявляет пептидазную активность. Благодаря относительно малой молекуле, ингибитор медленно диализует через мембрану коллодия. Описан также ингибитор катепсина. Он тоже отличается меньшей молекулярной массой, чем сам фермент.

Небольшая часть пепсина и катепсина (около 1%) производимых в желудке попадают вместе со своими ингибиторами в кровь (эндокринный пепсиноген) и отсюда в мочу, причем преобладают ингибиторы. Эта форма фермента, называемая уропепсиногеном, выделяется в моче одного и того же лица, при одинаковом питании, в довольно постоянном суточном количестве. Последнее не зависит ни от количества выделяемой мочи, ни от ее удельного веса.

Определение пепсина для практических клинических нужд вышло в настоящее время из употребления. Уропепсиноген, несмотря на то, что был известен 90 лет, тоже не находил практического применения. Этим ферментом стали интересоваться лишь в последние годы. В связи с этим интересом мы приводим метод его определения, пригодный для клинических нужд.

Определение уропепсиногена по методу West-Ellis-Scott в модификации Kamenik и сотр. (9). Принцип пробы состоит в осаждении пепсином казеина молока. В модификации взят молочный порошок, происходящий из одного источника, так чтобы содержание белка было постоянным.

Реактивы: 1) ацетатный буфер с pH 4,9 (4,2 г NaOH и 9,2 мл ледяной уксусной кислоты доводят дистиллированной водой до 100 мл);

2) 2 Н HCl;

3) 0,2% водный раствор метилоранжа;

4) молочный субстрат (1,3 г молочного порошка растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 10 мл ацетатного буфера и фильтруют).

Проведение пробы: Мочу для исследования берут постоянно в одни те же утренние часы, во избежание дневных колебаний. Измеряют количество собранной в течение 3 часов мочи, набирают пипеткой 2 мл в пробирку и добавляют 0,1 мл 2 Н HCl и 0,05 мл индикатора. Подогревают в течение часа в термостате при температуре 37°C. После этой активации, переносят в пробирку, находящуюся в водяной бане с той же температурой 0,1 мл активированной мочи, добавляют к ней 0,9 мл предварительно подогретой дистиллированной воды и 1 мл ацетатного буфера, перемешивают, добавляют 0,5 мл молочного субстрата и снова перемешивают. Измеряют секундомером время, проходящее до выпадения хлопьев казеина.

Результат вычисляют в единицах по формуле $\frac{V \cdot 100}{3 \cdot t}$, где V = количество мочи, t — время реакции в секундах. Норма в пределах 15—40 единиц/час.

Мочу, взятую для исследования, хранят в холодильнике до 14 дней, с несколькими каплями толуола. Активность пепсина или уропепсина определяют также по способу Anson для трипсина (описан ниже). Для этого вводят следующие изменения: 1) 2% раствор Hb приготавливают не на едком натре, а на 0,06 Н HCl с pH 1,8; 2) не ждут 30 минут от момента добавления трихлоруксусной кислоты до фильтрации.

ТРИПСИН И ХИМОТРИПСИН

Трипсин и химотрипсин представляют собой самые важные протеолитические ферменты панкреатического сока. Ферменты этого типа (гомоспецифические) встречаются в изобилии во многих тканях и органах, следовательно они не специфичны для поджелудочной железы. Они там называются катепсином В (8). Химотрипсины поджелудочной железы имеют два известных в настоящее время профермента — химотрипсиногены. Их молекулярная масса одинакова, но они различны по скорости движения в электрическом поле и по абсорбции. Активированные ферменты проявляют одинаковую специфич-

ность по отношению к субстратам, но разнятся степенью активности (5). Активация профермента происходит путем разрыва его циклической части, причем отделяется полипептид, который удалось изолировать и исследовать. Это превращение протекает оптимально при pH 6—9,0.

Химотрипсиноген может активироваться энтерокиназой (новое название: энтеропептидаза) кишечного происхождения. Следы трипсина и даже сам химотрипсин может вызвать аутокатализ, особенно в присутствии ионов кальция. Химотрипсин отличается сильной способностью створаживать молоко; трипсин почти лишен этого свойства, зато он располагает значительно большей протеолитической активностью. Наоборот, химотрипсин не проявляет коагулирующих свойств, характерных для трипсина. Химотрипсин расщепляет не только пептидные, но и амидные, эфирные, гидразидные и фосфамидные связи. Он может действовать в качестве эндо- и экзопептидазы. Принцип его действия состоит в том, что при расщеплении пептидной цепи у карбоксильной стороны находится всегда ароматический остаток. Активность химотрипсина тормозят ацилированные аминокислоты, некоторые производные жирных кислот и некоторые органические соединения фосфора, ингибирующие также и холинэстеразу.

Молекулярная масса трипсина равна около 34000. Трипсин неустойчив; он быстро инактивируется в растворе. Активность фермента весьма высока. Панкреатический сок содержит ингибитор с молекулярной массой около 6000. Сильный ингибитор трипсина с большой массой (89000) был обнаружен в коровьем молозиве, другие были найдены в бобах Соя и Лима, а также в белке куриного яйца. Сильный ингибитор трипсина находится также в живых клетках и в кровяной плазме.

Оптимум действия трипсина находится, как и у химотрипсина, при pH 8—9. Он особенно быстро разлагает денатурированный белок; на нативный белок он действует значительно слабее. Испытания на искусственных пептидах, а также на цепях А и В инсулина указывают на то, что действие фермента зависит от наличия такой связи, в которой карбоксильная сторона аминокислоты содержит щелочную группу. Эфиры подобной конфигурации также гидролизуются трипсином с еще большей скоростью, чем пептидные связи.

К неспецифическим свойствам трипсина принадлежит активация протромбина в тромбин, что обосновывает его коагуляционную активность. Помимо того, трипсин, при быстром введении в вену, активирует брадикининоген в брадикинин, а калликреиноген в калликреин. Указанные вещества вызывают падение кровяного давления. Эти явления не наблюдаются при медленном введении даже весьма больших количеств трипсина, благодаря сильным ингибиторам, находящимся в крови. Есть также предположение, что протеолитические ферменты типа трипсина могут играть роль „зачинщика“ в появлении симптомов аллергии (15). Наконец, из неспецифических признаков, свойственных также некоторым другим протеазам, следует упомянуть противовоспалительное действие. Зато предполагавшееся у трипсина тромбо- или фибринолитическое действие, оказалось недоказанным. Говоря о связях трипсина с системой свертывания крови, необходимо подчеркнуть, что трипсин не только может увеличить свертываемость крови (см. выше), но и вызвать геморрагический диатез вследствие исчезновения фибриногена из крови (12).

Метод определения трипсина по Anson (2).

Принцип: денатурированный гемоглобин подвергается перевариванию, после чего процесс прерывают и удаляют непереваренный гемоглобин, а в фильтрате определяют колориметрически или спектрофотометрически тирозин как продукт распада.

Реакти
гемоглоби
эритроцит
обычными
наполнен
Ставят на
KH₂PO₄
темпера
2) 5%
3) 0,5 Н
4) фено
Ход о
исследуем
кислоты
Эрленмей
но, 3 мл
пригодны
стандарт,
хлоруксус
к трихлор
Эмпириче
к mEq осв
трипсина.
7'5 и 11 X
изменения

Метод
vang (6)
трипсина
рому доб
определя
обеих пр
трипсина

Реакти
0,15;
2) буфер
3) крист
4) 3% н
5) биуре
Трипсин
температур
бавления
температур
Пригот
до pH 8, и
охлаждая
просветляе
фугируют
так, чтобы
и доводят
Пригот
ряют в 400
растворени
Ход ан
с 0,5 мл м
бации доба
1 мл 2 Н Н
прибавляе
37°, опреде
добавляют
Кривую
ставляет с
определени

Реактивы: 1) субстрат — щелочный раствор гемоглобина. Конечное pH 7,5. Источником гемоглобина могут быть промытые и гемолизированные эритроциты воловьей крови. Тени эритроцитов отделяют центрифугированием. Концентрацию гемоглобина определяют обычными способами. 2,2 г гемоглобина вводят в колбочку емкостью в 100 мл, наполовину наполненную водой, добавляют 36 г мочевины и 8 мл 1 Н NaOH и доводят водой до метки. Ставят на 30—60 минут при комнатной температуре, после чего смешивают с 10 мл 1 М KH_2PO_4 и 4 г мочевины. В качестве консерванта прибавляют 2 мг Mertiolat и хранят при температуре 5°;

2) 5% трихлоруксусная кислота (0,3 М);

3) 0,5 Н NaOH;

4) фенольный реактив Фолина, разбавленный водой в пропорции 1:3.

Ход определения: в пробирку, калиброванную при 25°, вливают 5 мл субстрата и 1 мл исследуемого материала. Через 10 минут переваривания добавляют 10 мл трихлоруксусной кислоты и через дальнейшие 30 минут отфильтровывают осажденный белок. В колбу Эрленмейера емкостью в 50 мл с 5 мл фильтрата наливают 10 мл едкого натра и, медленно, 3 мл разбавленного реактива Фолина, встряхивая. Голубое окрашивание становится пригодным для колориметрии через 5 минут. Результат выражают в mEq тирозина. Готовят стандарт, растворяя 8×10^{-4} mEq тирозина в 5 мл 0,2 М HCl вместо фильтрата, после трихлоруксусной кислоты. Холостую пробу готовят, добавляя 1 мл исследуемого материала к трихлоруксусной кислоте прежде, чем смешать последнюю с раствором гемоглобина. Эмпирическая стандартная кривая, на которую наносят единицы трипсина по отношению к mEq освобожденного тирозина, позволяет легко пересчитать результаты отсчета на единицы трипсина. 1, 2, 3, 4, 5 и 8×10^{-4} единиц, соответствуют освобождению 1'8, 3'5, 5'0, 6'3, 7'5 и 11×10^{-4} mEq тирозина, после вычета контрольной пробы. Тот же метод с небольшими изменениями может служить для определения активности пепсина или уропепсина.

Метод определения ингибитора трипсина в моче по Н. J. Faarvang (6). Принцип: протеолитическую активность заданного количества трипсина сравнивают с активностью такого же количества трипсина, к которому добавили заданное количество мочи. Количество переваренного белка определяют колориметрически, пользуясь биуретовой реакцией. Разность обеих проб служит основанием для количественного определения торможения трипсина.

Реактивы: 1) буфер I: 0,05 М барбитурат натрия, pH 7,55 + NaCl до ионной силы 0,15;

2) буфер II: буфер I + 0,01 М $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

3) кристаллический трипсин (24,4 единицы Anson/г);

4) 3% казеин, выдержанный при pH 7,55 и разбавленный буфером I;

5) биуретовый реактив по Dittebrandt.

Трипсин растворяют в 0,025 Н HCl (24 мг/100 мл). Этот раствор можно хранить при температуре 4° до 1 месяца. Из него готовят рабочий раствор путем прибавления 0,5 мл к 15,5 мл буфера II. Стойкость рабочего раствора — 2 часа при комнатной температуре.

Приготовление казеина: 3,0 г казеина растворяют в 100 мл воды, подщелоченной до pH 8, и кипятят 15 минут, затем добавляют по каплям 2—3 мл 1 Н HCl, помещивая и не охлаждая раствора. В момент осаждения казеина быстро приливают 4 мл 1 Н HCl. Раствор просветляется, его pH 2—2,2. Доливают 150 мл 0,17 М HClO_4 и ставят на ночь. Центрифугируют осажденный казеин, декантируют жидкость и несколько раз промывают осадок, так, чтобы он не был кислым. Растворяют в буфере I, добавляют 0,15 Н NaOH до pH 7,8 и доводят смесь буфером I до объема 100 мл.

Приготовление биуретового реактива: 9 г виннокислого натрия-калия растворяют в 400 мл 0,2 Н NaOH. Добавляют 3 г кристаллического CuSO_4 , затем 5 г KJ, а после растворения доливают 0,2 Н NaOH до 1000 мл. Хранят при +4°.

Ход анализа: 0,5 мл буфера II, содержащего 3,75 μg трипсина, инкубируют при 37° с 0,5 мл мочи, соответствующим образом разбавленной буфером II. После 20 минут инкубации добавляют 2 мл казеина и повторно инкубируют в течение 40 минут, затем добавляют 1 мл 2 Н HClO_4 . Ставят на 1 час, при комнатной температуре, фильтруют и к 2 мл фильтрата прибавляют 1 мл 2 Н NaOH и 3 мл биуретового реактива. Через 40 минут, при температуре 37°, определяют оптическую плотность при длине волны 545 м μ . В холостой пробе HClO_4 добавляют после 20 минут инкубации мочи с трипсином, перед добавлением казеина.

Кривую разведений трипсина готовят путем определения чистого трипсина. Она представляет собой прямую, проходящую через ноль, поэтому достаточно одного определения.

Ввиду трудности приобретения препаратов трипсина с точным титром, рекомендуется принимать за основание сравнительной шкалы такое разведение мочи, которое дает торможение 50% активности взятого трипсина (20).

РЕНИН

Ренин является протеазой почечного происхождения, появляющейся в крови в случаях аноксии почек. Он имеет характер лейцин-аминопептидазы. Этот фермент действует на специфический субстрат, которым служит белок из группы α_2 -глобулинов, называемый гипертензиноген или преангиотонином. Вследствие переваривающего действия ренина от гипертензиногена отщепляется полипептид, называемый гипертензином или ангиотонином, обладающий свойством повышать артериальное давление крови. Его действие кратковременно, так как его быстро уничтожает очередной протеолитический фермент, гипертенгиназа или ангиотониназа. Значение этого механизма в патогенезе разных форм гипертонии еще не вполне выяснено. Определение активности этого фермента не вошло в программу стандартных клинических анализов.

ПРОТЕИНАЗЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ

Тромбокиназа, тромбин и плазмин являются дальнейшими протеолитическими фермента большого значения (11).

Тромбокиназа, согласно современным взглядам, образуется из двух факторов, из коих один присходит из плазмы, а второй из тромбоцитов. Ранее предполагали, что она возникает путем активации тромбопластиногена. Тромбокиназа находится также и в тканях. Тканевая тромбокиназа, по-видимому, активнее плазменной; притом она сразу имеет активную форму. Химически она является липопротеидом.

Тромбин представляет собой белок, вероятно глюкопротеид, с массой около 77000. Он разлагает пептидные глицильные связи фибриногена с отщеплением низкомолекулярного пептида, заканчивающегося глутаминовой кислотой. Он образуется из неактивного фермента протромбина под влиянием тромбокиназы. Протромбин производится клетками ретикуло-эндотелиальной системы, главным образом в печени, при участии витамина К. Тормозящее влияние дикумарола на образование протромбина состоит, по всей вероятности, в конкурентном действии, обусловленном его структурной аналогией с витамином К.

За единицу NIH (National Institute of Health) тромбина принято такое его количество, которое в течение 15 секунд, при температуре 28° свертывает 1 мл стандартизированного раствора фибриногена. Один мл плазмы содержит около 300 единиц NIH.

Фибринолизин или плазмин образуется из пламиногена, активируемого разнообразными ферментными факторами клеток и бактерий, или трипсином. Хлороформ также является активатором. Если плазма долго стоит, начинается спонтанный фибринолиз. Осаждение альбуминов плазмы, связанное с удалением весьма сильного ингибитора, резко ускоряет фибринолиз. Плазмин представляет собою зуглобулин, приближающийся по условиям действия к трипсину. Однако, в отличие от последнего, плазмин не разлагает бензоил-L-аргининамид. Пламиноген уже получен в кристаллической форме, плазмин еще не удалось кристаллизовать. Эти ферменты обладают также неспецифическим действием, например, тромбин атакует казеин, а плазмин кроме того и желатину. Однако, в принципе, это высокоспецифи-

ческие ферменты, направленные на основные белки свертывания крови фибриноген и фибрин, и поэтому о них будет речь в соответствующей главе. Здесь приводятся методы их определения.

Определение времени фибринолиза в сгустках, образуемых в эуглобулиновой фракции плазмы (11, 10). Принцип: фракция эуглобулинов, осажденная в разбавленной плазме, предварительно доведенной до изoeлектрической точки (рН 5,3), содержит плазминоген, фибриноген и все компоненты, необходимые для его свертывания, за исключением ионов кальция. Она не содержит ни ингибиторов системы свертывания, ни ингибиторов фибринолитической системы. После прибавления хлористого кальция раствор эуглобулинов свертывается, а нетормозимый плазмин растворяет сгусток.

Реактивы: 1) оксалат аммония 0,1 М;

2) хлористый кальций 0,025 М;

3) уксусная кислота 1%;

4) боратный буфер в составе хлористый натрий 0,9% и бура 1%.

Проведение анализа: кровь берут в посуду с 0,1 М оксалатом аммония в пропорции: 1 часть оксалата на 9 частей крови. Плазму получают, центрифугируя смесь в течение 10 минут при 1500 оборотов в минуту.

К 0,15 мл плазмы добавляют 8 мл дистиллированной воды и 0,15 мл 1% уксусной кислоты. рН раствора должно приближаться к 5,2. После 30 минут инкубации при температуре +4° пробу центрифугируют при 1500 оборотов в минуту. Отливают надосадочную жидкость, и осадок растворяют в 0,5 мл боратного буфера. Пробирку ставят в водяную баню и, через несколько минут, добавляют 0,5 мл 0,025 М хлористого кальция. Образующийся через несколько минут сгусток наблюдают каждые 10 минут, вплоть до полного расплавления.

Интерпретация. Время от момента добавления хлористого кальция до полного растворения сгустка является мерой активности плазмина. Время определяется в минутах.

Фибринолиз сгустков цельной плазмы (14). Принцип: сгустки цельной плазмы разбавляют буфером и растворяют фибринолитическими ферментами в течение нескольких часов.

Реактивы: 1) 9,71 г трехводного ацетата натрия и 14,71 г медиала растворяют дистиллированной водой до объема 500 мл. К 50 мл этого раствора приливают 45 мл 0,1 Н НСl и с помощью 0,85% NaCl доводят объем до 1 л; рН доводят до 7,4 при помощи 0,1 Н НСl. Этот раствор служит для разведения плазмы;

2) тромбин 20 единиц/мл.

Ход определения: кровь берут в пробирку в пропорции 1 часть 3,8% лимоннокислого натрия на 9 частей крови. Центрифугируют 10 минут при 1500 оборотов в минуту. Плазму разбавляют буфером с рН 7,4 в пропорциях: 1:60, 1:80, 1:100. К 4 мл разбавленной плазмы добавляют 0,2 мл тромбина. Наблюдают расплавление образовавшегося сгустка в водяной бане, при температуре 37°. Время записывают в минутах.

Определение антиплазмина в плазме (16, 18). Принцип: фибринолитическая активность очищенных препаратов плазмина инактивируется плазмой в зависимости от содержания антиплазмина. Активность антиплазмина определяют, сравнивая: а) время фибринолиза сгустка, образованного из очищенного фибриногена под влиянием одного плазмина, б) время фибринолиза в той же системе с добавлением исследуемой плазмы в разведении.

Реактивы: 1) боратный буфер по Palitsch;

2) фибриноген по Kekwick, 0,2% раствор;

3) тромбин 20 единиц/мл;

4) плазмин: спонтанно-активный был получен по методу Norman (Norman P. S. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1957, 96, 709) из человеческого плазминогена, приготовленного по Kline (Kline D. L. J. Biol. Chem. 1953, 204, 949).

Концентрация плазмينا должна быть подобрана так, чтобы время расплавления сгустка, образуемого без добавления плазмы, составляло 3—5 минут.

Ход определения: в боратном буфере готовят разведения от 1:2 до 1:20 0,2 исследуемой и контрольной плазмы или 0,2 мл буфера. Добавляют 0,2 мл плазмينا. Инкубируют 5 минут при температуре 37°, добавляют 0,4 мл 0,2% фибриногена и 0,1 мл тромбина. Определяют время растворения образовавшихся сгустков в водяной бане при температуре 37°. При серийном определении антиплазмينا рекомендуются такие разведения плазмы, для которых время лизиса сгустка равно 8—12 минут.

Время лизиса контрольной пробы (только с буфером, без плазмы) должно равняться 3—5 минутам. Результаты выражают в минутах или в процентах к норме (интерполяция кривой разведений стандартной плазмы) или в показателе.

$$F = \frac{\text{время лизиса сгустка пробы с плазмой больного}}{\text{время лизиса сгустка пробы с плазмой здорового}}$$

ЛИТЕРАТУРА

1. Abderhalden R.: Klinische Enzymologie, Thieme; Stuttgart 1958. — 2. Anson M. L.: J. Gen. Physiol.; 1938, 22, 79. — 3. Bergmann M., Fruton J. S.: Ann. N. Y. Ac. Sci, 1944, 45, 409. — 4. Bodansky O.: Am. J. Med. 1959, 27, 861. — 5. Colowick P., Kaplan N. O.: Methods in enzymology. Ac. Press New York, 1955. — 6. Faarvang H. J.: Acta Endocrin, 1959, 30, 285. — 7. Grossmann W., Schneider F.: Ergebn. Enzymforsch., 1936, 5, 79. — 8. Hoffmann-Ostenhof O.: Enzymologie, Springer; Wien, 1954. — 9. Kamenik A., Prokopowa W., Towarek J.: Pol. Tyg. Lek. 1958, 13, 981. — 10. Kowalski E., Kopeć M., Niewiarowski S.: J. Clin. Pathol., 1959, 12, 215. — 11. Kowarzyk H., Buluk K.: Post. Hig. Med. Dośw., 1950, 2, 1. — 12. Laufman H., Roach H. D.: Arch. Surg., 1953, 66, 552. — 13. Martin G. J., Brendel R., Beiler J. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954, 86, 636. — 14. Mitchell I. R. A.: Lancet; 1959, II, 435. — 15. Nicolau S. G., Badanoiu Al.: Presse Med., 1961, 69, 1161. — 16. Niewiarowska M., Węgrzynowicz Z.: Thrombosis et Diathesis Haemorr.; 1959, 3, 279. — 17. Niewiarowski S.: Pol. Tyg. Lek. 1952, 7, 146. — 18. Niewiarowski S.: Krzepnięcie krwi, PZWL; Warszawa 1960. — 19. Taylor W. H.: Gastroenterology; 1961, 40, 823. — 20. Wehr H., Niewiarowski S.: Acta Physiol. Pol. 1953, 4, 141.

ПЕПТИДАЗЫ

MARIAN ORŁOWSKI

Пептидазы подобно протеазам являются ферментами, разрывающими пептидную связь. Первоначально предполагали, что они действуют только на малые пептиды. Позднее оказалось, что это различие не столь резко. Согласно классификации, предложенной Bergmann (10), пептидазы относят в группу т.н. „экзопептидаз“. Ферменты этой группы, вероятно, способны расщеплять только концевые связи в пептидной цепи. Некоторые из них в состоянии отщеплять концевые частицы аминокислот от белковой молекулы, зато другие катализируют расщепление пептидной связи только у малых пептидов. Классификация этих ферментов основывается в первую очередь на виде субстрата, на который они действуют, на скорости расщепления разных субстратов, а также на наличии аминогруппы или карбоксильной группы в конце пептидной цепи, атакуемой ферментом.

В биологическом материале обычно имеются несколько, или даже свыше десяти разных пептидаз, иногда с близкой специфичностью. Один и тот же пептид может быть объектом атаки нескольких ферментов одновременно, так что изолирование активности, относящейся только к одному определенному ферменту, весьма сложно. По этим соображениям, в сырых тканевых экстрактах часто приходится определять только сумму активности ферментов, действующих на один и тот же субстрат. Неудовлетворительно также изолиро-

вание отдельных активностей на основании разниц в оптимуме рН или при помощи разных активаторов и ингибиторов. Эти трудности являются причиной того, что например в сыворотке, за исключением отдельных, точно определенных пептидаз, нет возможности точно указать число ферментов. Большинство пептидаз требуют, для достижения полной активности, присутствия ионов определенных металлов. Это главным образом Co^{++} , Mn^{++} , и Zn^{++} . Способность человеческой сыворотки разлагать простые пептиды издавна известна (1, 11, 31, 51, 87). Происхождение пептидаз сыворотки неизвестно. Эти ферменты встречаются во многих тканях и органах. Особенно высокие активности были найдены в почках. В эритроцитах активность пептидаз якобы в 40—50 раз превышает их активность в плазме (2). Лейкоциты и лимфоциты также, по-видимому, богаты этими ферментами. Многие исследователи наблюдали увеличение активности пептидаз в лихорадочных состояниях, при шоке и ожогах (7, 31, 92). Предполагалось, что это увеличение может быть вызвано распадом лимфоцитов (23, 24), о чем свидетельствовала большая пептидазная активность в лимфоцитах и лейкоцитах (24, 36, 57), а также факт разрушения лимфоцитов в упомянутых патологических состояниях под влиянием стимуляции системы гипофиз-надпочечники (15). Дальнейшие исследования показали, что введение АКТГ и экстрактов надпочечников не вызывает повышения пептидазной активности сыворотки (66). Подобным образом, введение кортикостероидов собакам вызывало значительную лимфопению, но пептидазная активность не увеличивалась (71). Малокровие, вызванное у собак фенилгидразином, протекает с повышением пептидазной активности в сыворотке, по отношению к глицил-глицину и глицил-глицил-глицину. Это наблюдение вызвало подозрение о том, что повышение активности пептидазы сыворотки при шоке и ожогах обусловлено распадом эритроцитов. Часть пептидазы сыворотки происходит главным образом из печени. Об этом свидетельствует увеличение активности пептидаз при болезнях печени.

К наиболее важным пептидам, разлагаемым сывороткой человека, принадлежат глицил-глицин, глицил-лейцин, L-лейцил-глицин, глицил-L-тирозин (20), глицил-L-пролин, глицил-глицил-глицин, L-лейцил-глицил-глицин, L-аланил-глицил-глицин, а также γ -глутамил-пептиды (58, 83).

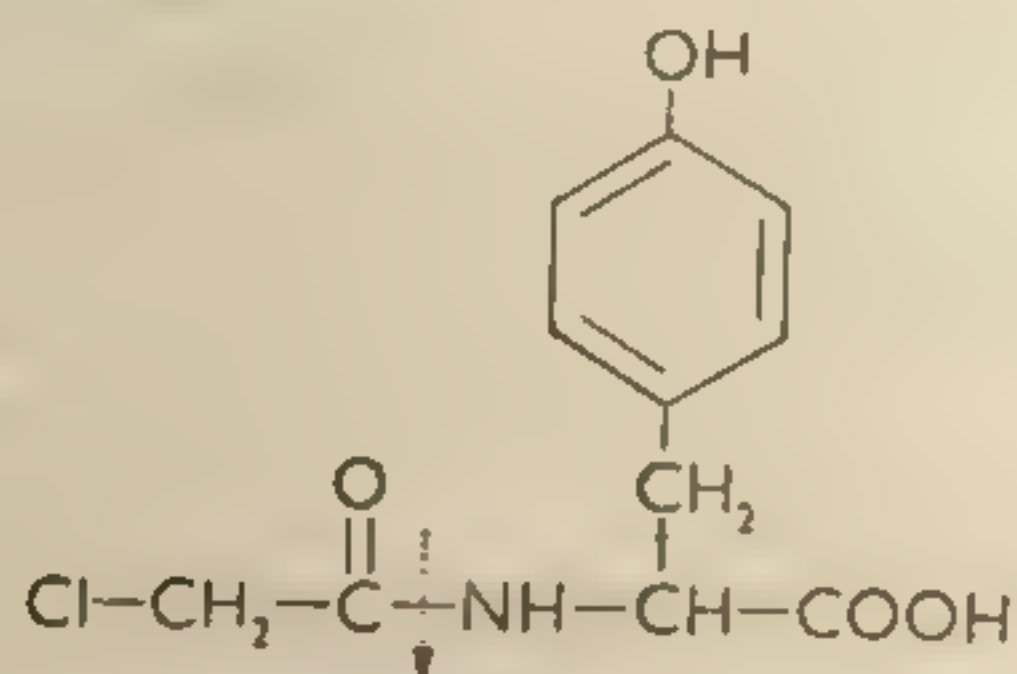
Кажется несомненным, что в сыворотке человека находятся следующие индивидуальные пептидазы: лейциламинопептидаза, глицил-глицил-дипептидаза, пролидаза, окситоциназа, аминотрипептидаза и γ -глутамил-транспептидаза.

КАРБОКСИПЕПТИДАЗА (К6П)

Этим названием определяют фермент или группу ферментов, катализирующих расщепление пептидной связи у пептидов или белков, на том конце пептидной цепи, на котором находится аминокислота со свободной карбоксильной группой. Наличие этих ферментов было обнаружено главным образом в поджелудочной железе.

Так называемая карбоксипептидаза А (К6П-А) была изолирована в кристаллическом виде из поджелудочной железы Anson (4, 5). Этот фермент выделяется поджелудочной железой в виде неактивного профермента, называемого прокарибоксипептидазой А. Активация фермента происходит под влиянием трипсина (5, 43). Кристаллическая К6П-А представляет собой металлопротеид, содержащий 1 грамматом цинка на моль фермента (85). К6П-А действует в первую очередь на пептиды, содержащие со стороны свободного карбоксила также ароматические аминокислоты, как фенилала-

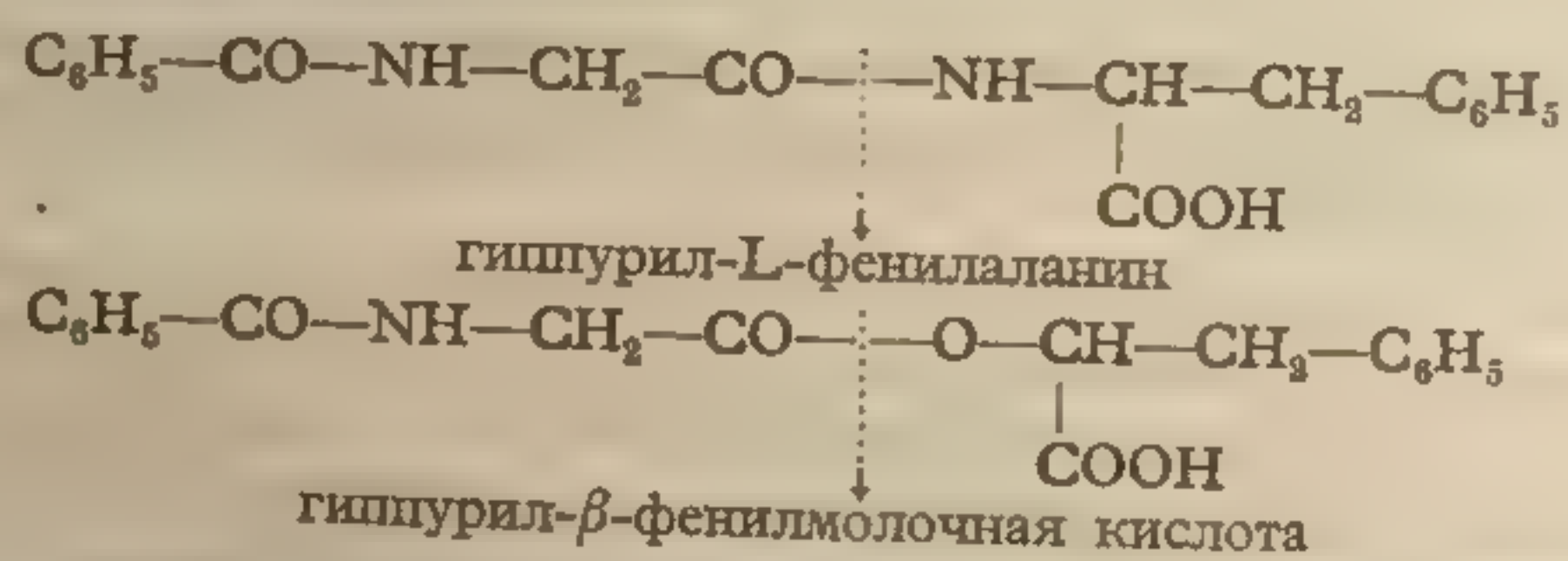
нин, тирозин и триптофан, или аминокислоты с разветвленной алифатической цепью, как лейцин и изолейцин (72). Примерным субстратом, расщепляемым КБП-А служит хлор-ацетилтирозин.



Пептиды, имеющие со стороны свободной карбоксильной группы цистеин, цистин или основные аминокислоты, не подвергаются гидролизу.

Из секрета поджелудочной железы был изолирован второй фермент, получивший название карбоксипептидазы В (22). II этот фермент имеет вид неактивного профермента, активируемого протеолитическими ферментами. КБП-В действует на пептиды со стороны свободной карбоксильной группы, состоящей из таких основных аминокислот, как аргинин, лизин и орнитин. Таким образом КБП-В обладает дополнительной специфичностью по отношению к КБП-А.

Кроме соответствующих пептидов, КБП-В расщепляет также с большей скоростью, аналогичные им сложные эфиры (78). Примерными субстратами этого типа служат гиппурил-L-фенилаланин и его аналог, гиппуровый эфир β-фенилмолочной кислоты.



Оптимум pH для КБП из поджелудочной железы составляет около 7,3. Ряд карбоновых кислот тормозят КБП, причем это торможение имеет конкурентный характер. Из числа этих соединений следует назвать кислоты: фенилпропионовую, фенилуксусную, бензилмалоновую, β-фенилмасляную и п-нитрофенилуксусную.

Ферменты, близкие по специфичности к панкреатической КБП, были обнаружены и в других тканях, в особенности в селезенке и почках. Они принадлежат к группе катептических карбоксипептидаз, или к группе катепсина IV. Это SH-ферменты, их оптимум находится преимущественно в кислой среде.

В сыворотке не обнаружено карбоксипептидазы; ее находят в панкреатическом соке человека.

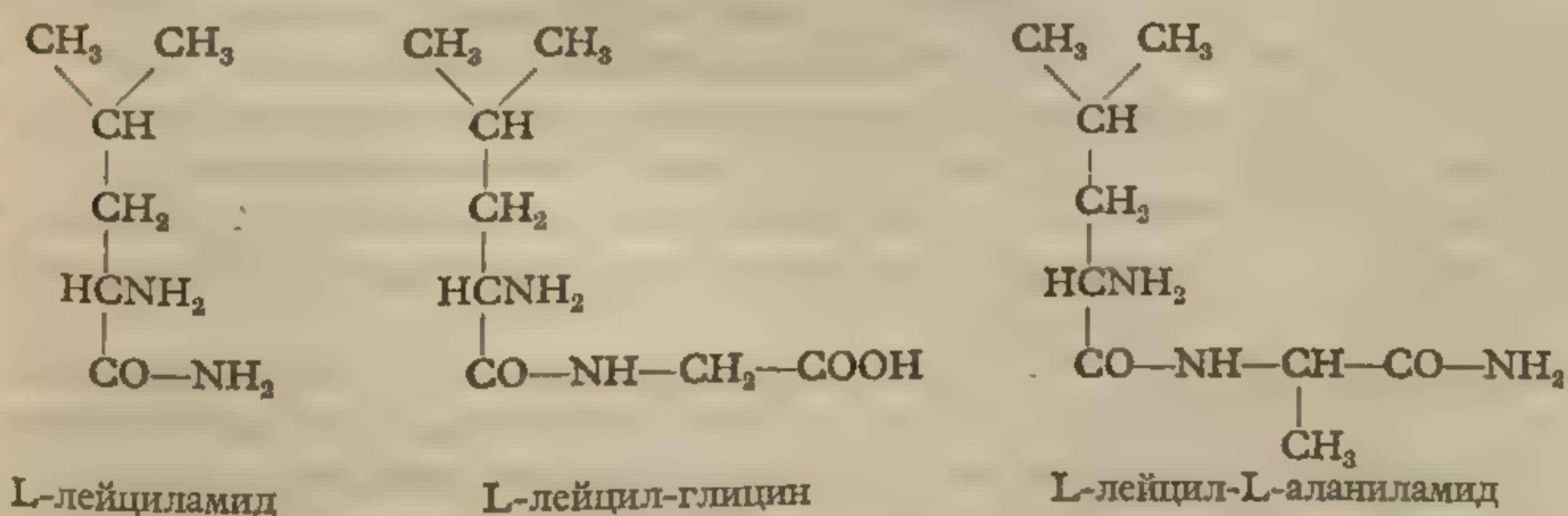
ЛЕЙЦИЛАМИНОПЕПТИДАЗА (ЛАП)

Linderstrom-Lang (47) обнаружил в слизистой оболочке кишечника фермент, обладающий способностью быстро гидролизовать пептиды со свободной аминогруппой, принадлежащей лейцину (N-концевая аминокислота), как у лейцил-глицина или лейцил-глицил-глицина. Фермент был позднее очищен и назван лейциламинопептидазой (ЛАП) (42). Очищенный фермент нуждается

для достижения полной активности в ионах Mg^{++} или Mn^{++} . Название фермента обусловлено тем, что он гидролизует лейциламид и лейцин-пептиды, но не действовал на субстраты с ацилированной аминогруппой.

Дальнейшие исследования показали, что ЛАП распространена во многих тканях. Ее нашли в вытяжках из почек, печени, селезенки, вилочковой железы, сердечной и скелетной мышц, гипофиза, матки, а также в моче и плазме (25). Фермент не был, однако, охарактеризован во всех тканях, так что с разными субстратами, или, даже при подобной специфичности, различных по эстеразной функции или роду активирующих металлов. Spackman и сотр. получили, путем фракционирования сернокислым аммонием и ацетоном, а также при помощи хроматографии на бумаге, почти 1700-кратную очистку фермента из свиных почек (79). Молекулярный вес очищенного фермента приближен к 300000. По-видимому, он активируется исключительно ионами Mg^{++} и Mn^{++} , ионы Ca^{++} и Co^{++} не влияют на его активность. Ионы Ni^{++} , Zn^{++} и Fe^{++} проявляют слабое тормозящее действие; сильными ингибиторами фермента являются ионы Cd^{++} , Cu^{++} и Hg^{++} . Ионы Mg^{++} стабилизируют высокоочищенный фермент, особенно в концентрации 0,005 M; хелирующие соединения, удаляющие ионы магния и марганца, могут вызвать необратимую инактивацию фермента.

ЛАП разбивает только пептидные связи N-концевой аминокислоты в L конфигурации. Ряд аминокислот, образующих свободную аминогруппу в пептидной цепи, подвергаются отщеплению, при условии наличия свободной аминогруппы. Амиды соответствующих аминокислот также расщепляются ферментом. Первоначально предполагали, что фермент не атакует эфиры аминокислот (74, 75), однако, впоследствии был доказан гидролиз ряда эфиров аминокислот посредством ЛАП (70), например бутилового эфира L-лейцина, хотя скорость его распада по сравнению со скоростью распада L-лейциламида была невелика. Фермент не проявляет транспептидазной активности (40). Специфическим субстратом для ЛАП считается L-лейциламид. Первоначально для определения активности ЛАП довольно часто применялся лейцил-глицил-глицин. Этот субстрат разлагается не только ЛАП, но и аминотрипептидазой, зато L-лейциламид расщепляется исключительно ЛАП, а не трипептидазой. Скорость разложения ферментом разных пептидов лейцина зависит также от участия в реакции ионов Mn^{++} или Mg^{++} . Быстрее всего разлагаются следующие субстраты: L-лейциламид, L-лейцил-L-лейцин, L-лейцил-глицин, L-лейцил-L-аланиламид, L-лейцил-L-валиламид.



Субстраты лейциламинопептидазы

Со значительной скоростью разлагаются также те пептиды, концевая аминогруппа которых входит в состав L-аланина и L-гистидина, как например L-аланил-L-лейцин и L-гистидил-глицин. Намного медлен-

нее расщепляются пептиды со свободной группой, принадлежащей глицину. Глицил-L-лейцин, например, гидролизует в 10 раз медленнее, а глицил-глицин почти в 100 раз медленнее, чем L-лейцил-L-лейцин или L-лейциламид. D-лейциламид и D-лейцил-глицины не подвергаются расщеплению.

Не было обнаружено торможения ЛАП йодацетамидом или п-хлормеркурибензоатом, что доказывает, что для активности фермента последний не нуждается в присутствии SH групп. Фермент сильно тормозится соединениями, связывающими металлы, как ЭДТК (этилендиаминтетрауксусная кислота) или цитраты.

Очищенные препараты ЛАП применялись при исследовании структуры белков. Было доказано, что фермент обладает способностью отщеплять N-концевые аминокислоты у разных молекул белка (41).

При исследовании активности ЛАП по отношению к L-лейциламиду была обнаружена активация фермента ионами Ca^{++} и торможение ионами Mg^{++} и Mn^{++} . Подобные свойства обнаруживает фермент сыворотки при определении его активности по отношению к L-лейцил-глицину (20). Это противоречит наблюдению, указывающему на то, что лейциламинопептидаза из разных тканей, после очистки, нуждается для достижения полной активности в ионах Mg^{++} и Mn^{++} . Возможно, что сыворотка содержит фермент в активной форме. В пользу этого предположения говорит факт, что предварительная инкубация сыворотки с ЭДТК заметно уменьшала активность ЛАП. Активность ЛАП, определяемая при L-лейциламиде, без добавления ионов металлов, составляет у здоровых лиц в среднем 0,908 (0,44—1,21) μM на мл сыворотки в час. Оптимум pH фермента сыворотки для гидролиза L-лейциламида составляет 8,0 (38).

Gomori предложил определять активность аминопептидазы сыворотки при помощи хромогенных субстратов, представляющих собой соединение глицина и аланина с нафтиламином. В ходе реакции освобождается нафтиламин, образующий с диазониевыми солями диазопигменты. Последние можно определять колориметрически (29). Этими субстратами можно одновременно воспользоваться для гистохимической локализации фермента в тканях. Green и сотр. (33) ввели, для определения активности ЛАП в сыворотке и тканях, синтетический L-лейцил- β -нафтиламид. Модификацию этого метода разработали Goldbarg и сотр. (26). Для этого субстрата оптимум pH ЛАП, как в моче, так и в сыворотке был равен 7,2.

Повышение активности ЛАП было констатировано в сыворотке беременных, особенно в конце периода беременности (33), а также в известном проценте случаев при злокачественных новообразованиях (26, 14). Рост активности ЛАП наблюдается при остром панкреатите, эпидемическом гепатите, механической желтухе и при метастазах злокачественных опухолей в печени. Увеличение активности ЛАП в сыворотке, по некоторым авторам, можно использовать в диагностике рака поджелудочной железы (62). По этому вопросу мнения авторов расходятся (52).

При электрофорезе белков сыворотки активность ЛАП можно обнаружить в постальбуминовой фракции, или же в пределах быстродвижущейся фракции α_2 -глобулинов в постальбуминовой области. У больных механической желтухой, при неоплазматических метастазах в печени и в случаях заболеваний печеночной паренхимы в белках сыворотки наблюдаются два добавочных пика активности ЛАП, исчезающие при обратном развитии болезней печени. Электрофоретическая подвижность ЛАП сыворотки у больных раком остается нормальной, если болезнь не осложнится закупоркой общего желчного протока или метастазами опухоли в печень (46).

АМИНОТРИПЕПТИДАЗА

Аминотрипептидаза представляет собой распространенный в тканях фермент, гидролизующий ряд трипептидов. Фермент атакует пептидную связь, прилегающую к свободной аминогруппе трипептида (76). Из типичных для этого фермента субстратов следует назвать глицил-глицил-глицин (ГГГ), глицил-глицил-саркозин, глицил-глицил-L-пролин, L-лейцил-глицил-глицин (ЛГГ), глицил-глицил-L-лейцин и L-аланил-глицил-глицин (АГГ). Металлы, по всей вероятности, не оказывают активирующего влияния на фермент. Лучшим субстратом для аминотрипептидазы является ГГГ, так как это вещество весьма слабо реагирует на лейциламинопептидазу.

В сыворотке человека обнаруживают активность фермента по отношению к ряду трипептидов (24, 76). Оптимум pH для гидролиза ГГГ в сыворотке равняется 6,8 (20). Согласно данным Haschen (37) оптимум pH для разложения АГГ составляет 7,2, а для ЛГГ 7,6. Этот сдвиг оптимума pH для двух последних трипептидов, возможно, вызван тем, что на их гидролиз влияет лейциламинопептидаза, находящаяся в сыворотке. Оптимум pH аминотрипептидазы, получаемой путем очистки из человеческих эритроцитов, составлял для всех трех субстратов (ГГГ, ЛГГ, АГГ) 7,0. Активности в сыворотке при pH 7,2 по отношению к ГГГ, ЛГГ и АГГ образуют пропорцию 1 : 1,5 : 3. Те же цифры верны и для лейкоцитов; пропорция для эритроцитов составляет 1 : 2,5 : 7,0. Фермент в сыворотке сильнее всего активировался Co^{++} в концентрации 0,002 М. Значительно слабее действовали Zn^{++} , Mg^{++} и Mn^{++} . 86,0% торможения получалось при 0,001 М концентрации ЭДТК.

Происхождение аминотрипептидазы сыворотки неизвестно. Возможно, что в некоторой степени она происходит из лейкоцитов. Активность плазмы для ГГГ не увеличивается в продолжение 24 часов после нефрэктомии; следовательно, почки не играют существенной роли в выведении фермента из организма. В пользу этого предположения говорит также отсутствие роста активности фермента сыворотки при уремии. Одновременное определение активности для ЛГГ в бедренной артерии и печеночной вене указывает на исчезновение фермента из системы воротной вены, особенно при высокой активности фермента в сыворотке (68).

ГЛИЦИЛ-ГЛИЦИЛ-ДИПЕПТИДАЗА

Этот фермент специфичен по отношению к гидролизу глицил-глицина, но не разлагает других дипептидов. Кроме глицил-глицина, фермент гидролизует саркозил-глицин и глицил-β-аланин, но значительно медленнее. Для действия фермента необходимо наличие как свободной аминогруппы, так и свободной карбоксильной группы у гидролизуемого дипептида. Фермент активируется ионами Co^{++} , которые в определенных условиях могут быть замещены ионами Mn^{++} .

Сыворотка содержит глицил-глицил-дипептидазу (71). По Fleisher (19), в присутствии ионов Co^{++} в сыворотке наблюдаются три оптимума pH для разложения глицил-глицина: 6,2—6,3, 6,8 и 8,0—8,3. При отсутствии ионов Co^{++} активности весьма малы; для достижения полной активности необходима предварительная инкубация фермента с этими ионами. В присутствии ионов Mn^{++} гидролиз глицил-глицина обнаруживает только один оптимум pH при 7,4. Активность фермента в фосфатном буфере значительно ниже, чем в вероналовом, что вызвано осаждением фосфорнокислого магния. Судя по приведенным данным, гидролиз глицил-глицина в сыворотке катализируется более, чем одним ферментом.

ГЛИЦИЛ-L-ЛЕЙЦИЛ-ДИПЕПТИДАЗА

Этот фермент был открыт в человеческой матке и мышце крысы. Он активируется ионами Zn^{++} . Типичным для него субстратом служат глицил-L-лейцин; саркозил-L-лейцин и β -аланил-L-лейцин значительно медленнее разлагаются под его влиянием. Подобно другим дипептидазам, и этот фермент действует только на те субстраты, которые содержат свободные аминокислотные группы, прилегающие к атакуемой пептидной связи. Глицил-L-лейцин быстро разлагается сывороткой человека (19). Неизвестно, вызван ли этот распад специфической дипептидазой, или другими аминоксептидазами. Zn^{++} не активирует гидролиз этого дипептида, зато Mn^{++} проявляет в данном случае активирующее действие. При оптимальной концентрации Mn^{++} , оптимум pH для разложения глицил-L-лейцина составляет 9,4 в вероналовом буфере. В присутствии ионов Co^{++} , активность фермента и оптимум pH значительно ниже. По Haschen (39), глицил-L-лейцин в человеческой сыворотке разлагается при участии двух ферментов. Один из них проявляет оптимальную активность при pH 7,8, без ионов металлов, а второй оказывает действие лишь после активации ионами Mn^{++} и Co^{++} и его оптимум находится при pH 9,0. Первый фермент, возможно, тождествен дипептидазе, чувствительной к ионам Zn^{++} , обнаруженной в разных органах, а также в эритроцитах и лейкоцитах.

ИМИНОДИПЕПТИДАЗА — ПРОЛИНАЗА

Пролиназа представляет собой фермент, специфически разлагающий дипептиды со свободной иминогруппой пролина и гидроксипролина. Типичными для этого фермента субстратами являются L-пролил-глицин или L-гидроксипролил-глицин (32). Ферменты с такой специфичностью встречаются в кишечнике, селезенке и легких. Очищенные препараты фермента были получены из почек. Ионы Mn^{++} и Cd^{++} оказывают активирующее влияние на фермент (56).

ИМИДОДИПЕПТИДАЗА — ПРОЛИДАЗА

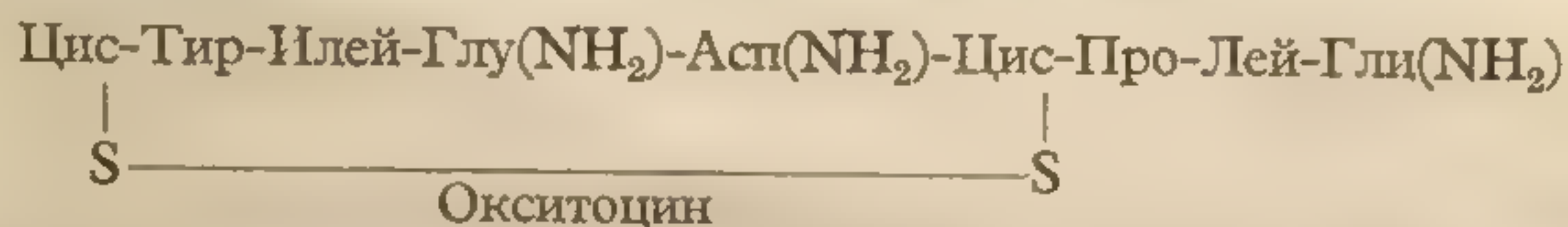
Этот фермент был открыт Bergmann и Fruton (8, 9) в слизистой кишечника. Он распространен в животных тканях. Он специфически катализирует расщепление пептидной связи, в которой находится иминогруппа пролина или гидроксипролина. Типичным субстратом для пролидазы служит глицил-L-пролин. Этот фермент является дипептидазой и нуждается для проявления каталитического действия в присутствии как свободной аминокислотной группы, так и свободной карбоксильной группы у атакуемого дипептида. Ионы Mn^{++} активируют фермент. Пролидаза из свиной почки была очищена в 12000 раз (16). Сыворотка содержит активную пролидазу (71, 77).

ОКСИТОЦИНАЗА (ОТЦ)

В крови беременных находят фермент, разлагающий гормон задней доли мозгового придатка — окситоцин. У небеременных женщин и у мужчин окситоцин инактивируется весьма медленно. Это явление впервые описал Fekete (18), а фермент, имеющий характер пептидазы, получил название окситоциназы (ОТЦ). Исследование активности этого фермента проводилось следующим образом: инкубировали сыворотку с окситоцином и, по истечении определенного времени, определяли количество неразложенного окситоцина

биологическим методом на изолированном роге матки крысы. Результаты этих исследований нашли подтверждение и были расширены многими авторами (60, 69, 88, 89, 90). Активность ОТЦ в сыворотке растет во время беременности; в период родов кровь матери разлагает в 60 раз больше окситоцина, чем в норме (69). После родов активность ОТЦ в плазме исчезает почти полностью в продолжение 10—14 дней. ОТЦ была обнаружена исключительно в плазме беременных женщин и, в одном случае, у беременной обезьяны-резуса. В плазме лошади, собаки, свиньи и морской свинки не было обнаружено активности фермента. Таким же образом ОТЦ разлагает орастин и синтетический гормон синтоцинон (12). Практическая ценность определения активности ОТЦ, по мнению авторов, состоит в возможности диагностировать беременность, а величина активности позволяет судить о продолжительности беременности. При беременности, осложненной угрожающим выкидышем, активность ниже положенной, по отношению к продолжительности беременности. Авторы полагают, что о внутриматочной гибели плода свидетельствует пониженная по отношению к его возрасту активность ОТЦ, или приостановление роста активности фермента в крови (69). Приведенным данным противоречат исследования Dicker и Tyler (17), утверждающих, что, начиная с половины беременности, активность ОТЦ в плазме уменьшается и почти полностью исчезает в конце этого периода.

Окситоцин представляет собой октапептид, в котором аминокислотная половина молекулы цистина образует N-концевую аминокислоту.



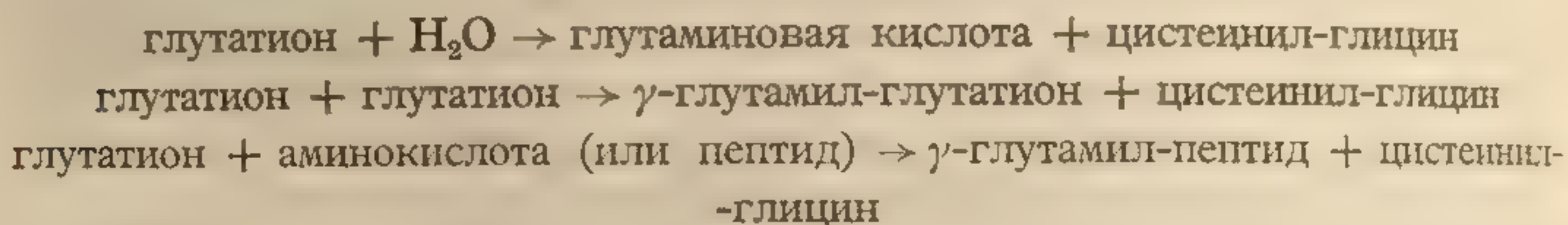
Воздействие ОТЦ на этот пептид, вероятно, заключается в разрушении пептидной связи, соединяющей N-концевую половину молекулы цистина с остальной частью пептида. Следовательно, этот фермент является специфической аминопептидазой. Turpy и Nesvadba (84) предложили синтетический хромогенный субстрат для определения активности ОТЦ L-цистинил-ди- β -нафтиламид, содержащий цистиновый фрагмент окситоцина, связанный с двумя молекулами β -нафтиламина. Оказалось, что сыворотка небеременных женщин очень медленно разлагает этот субстрат, зато сыворотка беременных действует на него значительно быстрее (55). Сыворотка человека содержит аминопептидазы, способные разлагать нафтиламиды ряда аминокислот. Испытывались глицил- β -нафтиламид, аланил- β -нафтиламид и лейцил- β -нафтиламид. Все эти субстраты разлагаются сывороткой мужчин, а также беременных и небеременных женщин, со значительной скоростью. Рост аминопептидазной активности по отношению к этим субстратам во время беременности значительно меньше, чем по отношению к цистинил-ди- β -нафтиламиду; это значит, что появляющийся во время беременности фермент сыворотки не тождествен с обычной лейциламинопептидазой (55).

Имеется предположение, что ОТЦ происходит из плаценты. Кажется несомненным, что L-цистинил-ди- β -нафтиламид разлагается не только окситоциназой, но и другими пептидазами. В пользу этого предположения говорит наличие в эритроцитах пептидазы, атакующей этот субстрат, а также увеличение активности сыворотки по отношению к этому субстрату при болезнях печени. Дальнейшие работы должны выяснить, во-первых, какие пептидазы разлагают цистиновый субстрат, во-вторых, какова специфичность ОТЦ по отношению к разным субстратам.

γ -ГЛУТАМИЛ-ТРАНСПЕПТИДАЗА (ГГТП)

ГГТП является ферментом, катализирующим перенос γ -глутамильного остатка с γ -глутамил-пептидов на аминокислоты или пептиды с образованием новых γ -глутамил-пептидов. Разница между этим и остальными, описанными в предыдущих главах, ферментами состоит в специфической ориентировке фермента на пептидные связи, в которых принимает участие γ -карбоксильная группа глутаминовой кислоты. Следующее различие состоит в том, что в то время, когда в реакциях, катализируемых остальными пептидазами, преобладает процесс гидролиза и транспептидация, если последняя вообще имеет место, представляет лишь незначительную часть реакции, то в реакциях, катализируемых ГГТП, в основном происходит транспептидация, а гидролиз субстрата отодвигается на задний план.

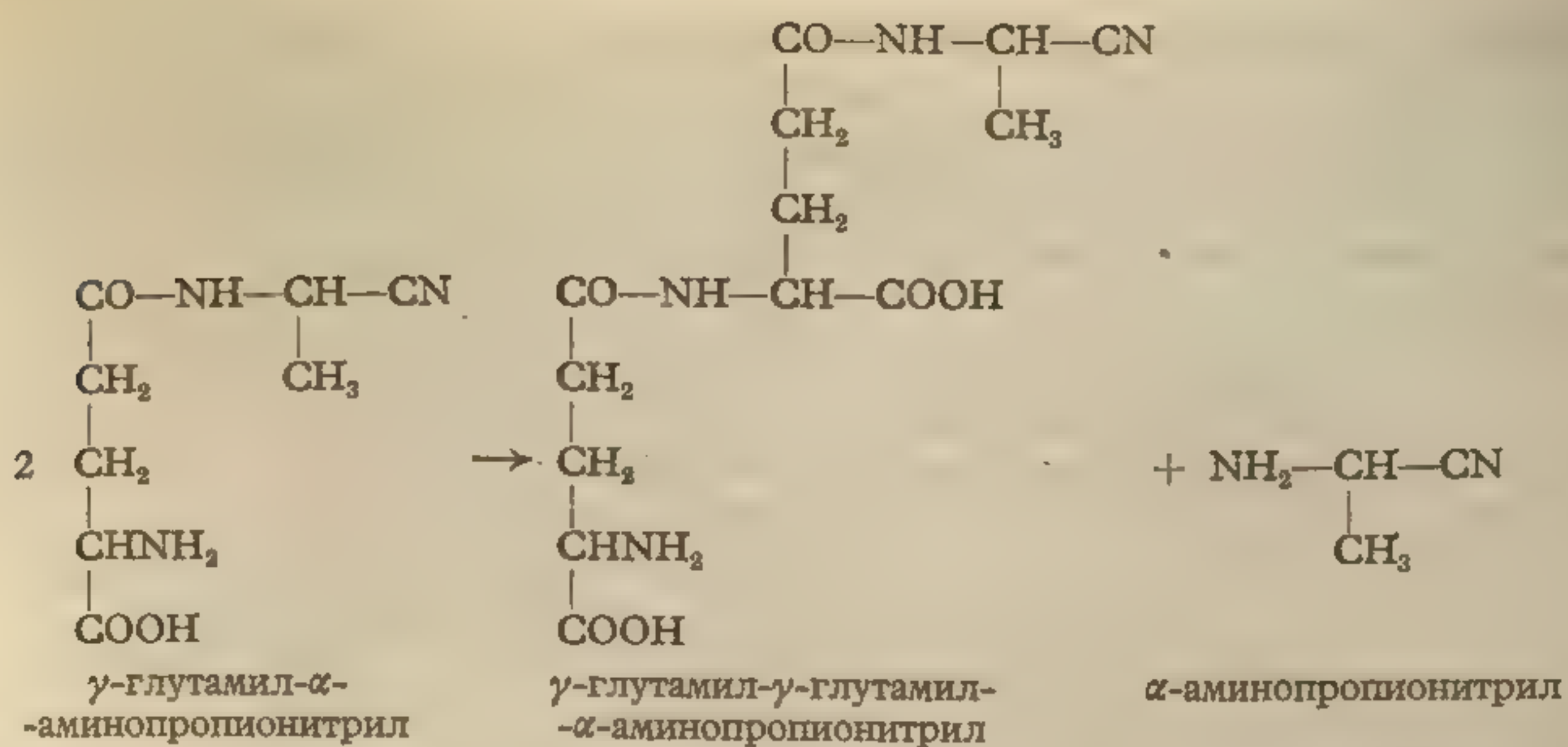
Реакция переноса γ -глутамильного остатка была впервые доказана при помощи хроматографии Hanes и сотр. в экстрактах из бараньей почки, с глутатионом в качестве субстрата (34). Акцептором γ -глутамильного остатка может быть сам глутатион или любая аминокислота, а также некоторые пептиды. При использовании глутатиона в качестве субстрата могут происходить следующие реакции (35, 6, 21, 44, 64):



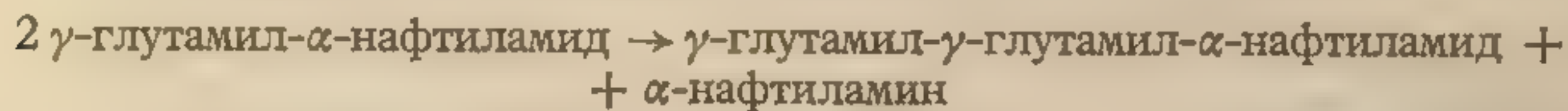
γ -глутамил-транспептидаза, быть может тождественна ферменту, ранее называвшемуся „глутатионазой“, разлагающему глутатион (44). Активирование разложения глутатиона рядом аминокислот и пептидов объясняется участием последних в качестве акцепторов γ -глутамильного остатка в реакции, катализируемой ГГТП. Руководствуясь приведенными выше уравнениями, можно определить распад глутатиона, измеряя количество освобожденного цистеинил-глицина или количество глутатиона, исчезающего из реакционной среды. Некоторые авторы (21) пользовались для определения цистеинил-глицина, образующегося при ферментативном разложении глутатиона, модификацией метода Sullivan и Hess (80). Однако, этот метод не давал хороших результатов в руках других работников (8). Применяли также метод с алюксаном Patterson и Lazarow (61) для определения количества разложенного глутатиона в реакциях, катализируемых ГГТП.

Применение глутатиона в качестве субстрата для ГГТП при pH около 9,0, оптимальном для ГГТП, скрывает в себе серьезную опасность, так как самоокисление этого соединения при данном pH может стать источником значительных ошибок.

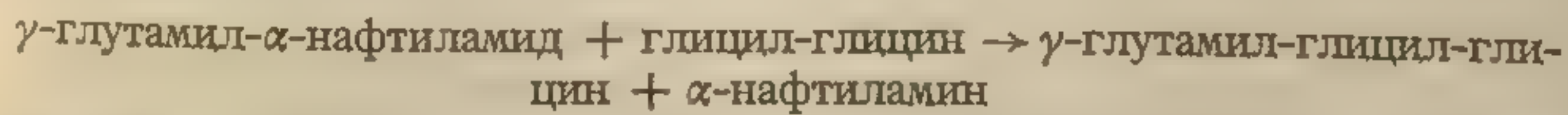
В 1960 году Orłowski и Szewczuk обнаружили в сыворотке человека и некоторых животных специфическую пептидазу, способную разрывать γ -глутамильную связь в ряде синтетических γ -глутамил- α -аминонитрилов. Был разработан метод определения активности этого фермента, причем субстратом служил γ -глутамил- α -аминопропионитрил (83). Дальнейшие исследования привели к идентификации этого фермента. Он оказался γ -глутамил-транспептидазой (58). По своим свойствам он близок ферменту, обнаруженному Hanes в экстрактах из почки овцы (34). При использовании упомянутого соединения в качестве субстрата, главной реакцией, катализируемой ферментом, является транспептидация:



Факт, что специфичность ГГТП ограничивается γ -глутамильным остатком, и что остальная часть пептида имеет второстепенное значение, сделал возможным и синтез и применение субстрата, позволяющего быстро определять активность фермента в сыворотке и тканях. Субстрат γ -глутамил- α -нафтиламид, введенный для определения ГГТП Orłowski и Szewczuk (59), служит в реакции, катализируемой данным ферментом, одновременно акцептором и донором γ -глутамильных остатков, причем реакция проходит главным образом соответственно уравнению:



Количество освобождаемого α -нафтиламина является мерой активности фермента. Применяя этот метод, авторы исследовали ряд свойств фермента и его распространение в человеческом организме. Самую высокую активность фермент проявил в почке. Принимая его активность в этом органе за 100%, можно выразить активность фермента в поджелудочной железе числом 8,3%, в печени 3,9%, в селезенке 1,5%. Исследование остальных органов практически не обнаружило активности ГГТП (59). Кроме сыворотки, фермент встречается постоянно в моче, желчи и в патологических жидкостях; в эритроцитах он отсутствует. Металлы не активируют фермент. Ввиду того, что ЭДТК тоже не оказывает влияния на активность фермента, можна полагать, что активность ГГТП не зависит от присутствия ионов металлов. N-этил-маленимид тормозит фермент в сыворотке на 60%, при концентрации 10^{-2} М. Моноиодацетат тормозит на 17% при той же концентрации. При концентрации 10^{-2} М глицил-глицин активирует фермент pH 8,8 на 90%, а L-глутамин и L-аргинин — приблизительно на 30%. Оптимум pH фермента в сыворотке равняется около 8,8. Активация глицил-глицином объясняется тем, что этот дипептид принимает участие в реакции, катализируемой ГГТП в качестве акцептора γ -глутамильных остатков, так как в его присутствии реакция проходит следующим образом:



Активирование аминокислотами идет по тем же механизмам. Глицил-глицин активирует фермент в зависимости от pH среды. При pH 7,4 активность фермента составляет лишь десять с лишним процентов, при pH 8,8 глицил-глицин активирует на 400%, а при оптимуме pH лишь на 90%. Следовательно,

в физиологическом диапазоне pH фермент почти неактивен в отсутствии акцептора γ -глутамильных остатков. Глутатион резко тормозит реакцию, катализируемую ГГТП с γ -глутамил- α -нафтиламидом в качестве субстрата, причем торможение имеет конкуритивный характер. ГГТП сыворотки, вероятно, происходит из печени, так как активность фермента изменяется преимущественно при болезнях печени; болезни почек в меньшей степени влияют на активность фермента сыворотки. Умеренное повышение активности ГГТП встречается при эпидемическом гепатите, хроническом гепатите и при сердечном псевдоциррозе печени на почве правожелудочковой недостаточности. Резкое увеличение активности фермента, иногда превышающее во сто раз физиологические величины, наблюдается при механической желтухе, холангите, а также при первичных и метастатических новообразованиях печени. Рост активности ГГТП в сыворотке сопровождает новообразования печени, даже без симптомов желтухи (81, 82).

При помощи γ -глутамил- α -нафтиламида удалось выявить локализацию ГГТП гистохимическим методом в разных тканях (3). В почках человека фермент был локализован преимущественно в щетковидной каемке извитых канальцев первого ряда, а также в феррейновых пирамидках. Не обнаружено активности фермента в клубочках и в собирательных канальцах. В поджелудочной железе фермент был найден во внешнесекреторной части. Его не было в лангергансовых островках (3).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДАЗ

При воздействии пептидаз на субстрат в реакционной среде появляются свободные карбоксильные и аминовые группы, количество которых может служить мерой скорости реакции и активности фермента. Увеличение количества свободных карбоксильных групп определяют титрованием в концентрированном спиртовом растворе, под влиянием которого происходит обратный ход диссоциации аминокрупп (91). Определяют также количество освобождаемых свободных аминокрупп титрованием их в присутствии нафтолкрасного, после добавления ацетона, противодействующего кислотности карбоксильных групп (48). Количество аминокрупп определяют также газометрическим методом van Slyke, превращая их азотистой кислотой в молекулярный азот (86). Следующим способом определения активности пептидаз является хроматографический метод, при помощи которого отделяют образующиеся в ходе реакции аминокислоты от субстрата и определяют их количественно после элюирования из бумаги. При исследовании активности пептидаз можно также воспользоваться способом с нингидрином. Он состоит в том, что свободные аминокислоты, получаемые при гидролизе пептида, дают более интенсивную цветную реакцию с нингидрином, чем сам пептид. По стандартной кривой, составляемой на основании растворов, содержащих субстрат (пептид) и продукты его распада в разных пропорциях, легко найти количество разложенного субстрата. Для определения активности трипептидазы используют также разницу интенсивности окрашивания медного комплекса глицил-глицил-глицина и соответствующих комплексов продуктов разложения этого трипептида, т.е. глицил-глицина и глицина (50).

В последние годы все чаще находят применение при определении активности, не только пептидаз, но и многих других ферментов, т.н. хромогенные субстраты. Это синтетические вещества, обычно содержащие химическую группировку, соответствующую по своей структуре специфичности фермента, связанную с колориметрически легко определяемым соединением. Под влиянием фермента освобождается хромогенная группа; ее количество, колориметри-

чески определенное, служит мерой активности фермента. Примером такого субстрата является лейцил- β -нафтиламид, введенный Green и сотр. для определения активности лейцинаминопептидазы (33). Этот субстрат содержит характерную L-лейцильную группировку, отвечающую условиям специфичности лейцинаминопептидазы. Под влиянием фермента происходит распад субстрата до L-лейцина и β -нафтиламина; последний служит для колориметрического определения (33). Имеются подобные субстраты для определения окситоциназы (84), γ -глутамилтранспептидазы (59), трипсина (65), химотрипсина (63) и других. Преимущество хромогенных субстратов состоит в возможности быстро и точно определять с их помощью активность фермента, а также, нередко производить гистохимическую локализацию ферментов в гистологических срезах. Некоторые лаборатории до сих пор определяют активность пептидаз в сыворотке при помощи разных пептонов и продуктов гидролиза белков. Такие субстраты не отвечают требованиям специфичности для индивидуальных пептидаз сыворотки. Они разлагаются одновременно несколькими ферментами, что значительно затрудняет интерпретацию получаемых результатов.

Определение активности пептидаз сыворотки по Smith и сотр. Метод заключается в титровании количества карбоксильных групп, освобождаемых во время ферментативной реакции по способу, предложенному Grassmann и Heyde (30). Активность аминотрипептидазы определяют по отношению к глицил-глицил-глицину, активность лейцинаминопептидазы по отношению к L-лейциламиду, а пролидазы по отношению к глицил-L-пролину. Авторы определяют активность всех пептидаз при pH 7,8.

Реактивы: 1) раствор субстрата 0,125 М готовят, растворяя в мерных колбочках емкостью по 10 мл, 236 мг глицил-глицил-глицина, 208 мг хлористоводородного L-лейциламида, 165 мг глицилглицина и 226 мг глицил-L-пролина. Каждый из растворов доводят до pH 7,8 едким натром; 2) вероналовый буфер 0,1 М pH 7,8; 3) 0,01 М раствор CoCl_2 и 0,01 М раствор MnCl_2 ; 4) 0,01 М раствор КОН в 90% этаноле; 5) 100% этанол; 6) 0,1% раствор тимолфталейна в 95% этаноле.

Ход определения: в колбочку емкостью в 2,5 мл отмеривают 1,0 мл соответствующего субстрата и добавляют 0,75 мл вероналового буфера. К инкубационной смеси с глицил-глицином добавляют 0,25 мл 0,01 М CoCl_2 , а к инкубационной смеси с L-лейциламидом и глицил-L-пролином приливают 0,25 мл 0,01 М MnCl_2 . После преинкубации смеси в течение 15 минут при температуре 40° к каждой пробе добавляют 0,5 мл сыворотки, до окончательного объема 2,5 мл. Конечная концентрация субстрата составляет 0,05 М. Берут 0,2 мл пробы из инкубационной смеси через 0, 1, 2, 8 и, в случае надобности, через 24 часа инкубации. Титруют каждую пробу спиртовым раствором КОН до первого синего перехода, с тимолфталейном в качестве индикатора (2 капли). Прибавляют 1,8 мл 100% этанола и заканчивают титрование спиртовым раствором КОН. Разница в титровании между начальной и следующими пробами дает количество освобожденных карбоксильных групп. Гидролиз субстрата авторы описывают как константу реакции первого порядка.

$$K = \frac{1}{t} \log \left(\frac{100}{100-x} \right)$$

где x означает % гидролизованного субстрата за время t в минутах.

Описанный метод требует большого количества дорогих субстратов.

Определение активности лейцинаминопептидазы (ЛАП) по методу Green и сотр. (33) в модификации Goldbarg и сотр. (26). Метод состоит в колориметрическом определении количества β -нафтиламина, освобожденного за время действия ЛАП на субстрат, L-лейцил- β -нафтиламид. Нафтиламин определяют при помощи модифицированной реакции Bratton и Marshall (13).

Реактивы: 1) 0,2 М фосфатный буфер с pH 7,0 готовят, смешивая 170 мл 0,2 М NaH_2PO_4 с 330 мл 0,2 М Na_2HPO_4 ; 2) субстрат: 40 мг хлористоводородного L-лейцил- β -нафтиламида растворяют в 100 мл H_2O . Перед определением смешивают равные части 0,2 М фосфатного буфера и раствора субстрата. Стойкость реактива — около 1 месяца, при температуре 4°; 3) 40% трихлоруксусная кислота; 4) 0,1% раствор азотистокислотного натрия — всегда свежий; 5) 0,5% водный раствор сульфата аммония; 6) двухлористоводородная соль N-(1-нафтил)-этилендиамина — 0,5 мг вещества в 1 мл 95% этанола; 7) стандартный раствор β -нафтиламина, содержащий 60 мг вещества в мл 0,1 М фосфатного буфера с pH 7,0.

Ход определения: 1 мл сыворотки, разбавленной 1:50, добавляют к 1 мл смеси буфера и субстрата, перемешивают и инкубируют в течение 2 часов при температуре 37°. По истечении этого времени реакцию приостанавливают, добавляя 1 мл 40% трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют и отмеривают 1 мл прозрачной жидкости в пробирку для определения β -нафтиламина. Контрольную пробу готовят, добавляя сыворотку после трихлоруксусной кислоты. Для определения β -нафтиламина прибавляют к 1 мл центрифугированной жидкости 1 мл 0,1% NaNO_2 , затем, спустя 3 минуты, 1 мл сульфата аммония, с целью растворить избыток нитрита, а через 2 минуты прибавляют 2 мл двухлористоводородной соли N-(1-нафтил)-этилендиамина. Пробирки ставят в водяную баню с температурой 37°, на 60 минут, а затем колориметрируют сравнивая с контрольной пробой при 560 мμ. Количество освобожденного во время инкубации β -нафтиламина отсчитывают по стандартной кривой, составленной при тех же условиях, на основании проб, содержащих от 3 до 60 мг β -нафтиламина в мл раствора.

Сыворотка не теряет активности при условии хранения в продолжение 7 дней в холодильнике или 3 дней при температуре 22°.

Активность фермента в моче определяют после 24-часового диализа против проточной воды; затем производят определение так же, как и в сыворотке, причем разбавляют мочу водой 1:10. Диализированная моча не теряет активности, если ее хранить в течение 7 дней при температуре 4°. Определяя активность в желчи, последнюю разбавляют в пропорции 1:100. Если фермент гидролизует более 50% субстрата, исследование повторяют с более высоким разведением фермента.

За меру активности ЛАП авторы принимают количество фермента, освобождающее, в условиях опыта, 1/12 μг β -нафтиламина.

Меру активности фермента в моче авторы выражают числом мг β -нафтиламина, освобожденного суточной порцией мочи, в стандартных условиях.

Активность в сыворотке у мужчин равна в среднем 142 ед., у женщин 130 единиц. В моче у мужчин средняя активность составляет 82, у женщин 43 единицы (27).

Gomori определял активность аминопептидазы в сыворотке и моче при помощи синтезированных им α - и β -нафтиламидов глицина и аланина (29). Глицил- α -нафтиламид разлагался в 6—8 раз медленнее β изомера, а аланил- β -нафтиламид в 4—5 быстрее соответствующего производного глицина. Gomori выявил, что хлорацетильные дериваты α - и β -нафтиламида подвергаются разложению тканевыми вытяжками и сывороткой. Этот распад, вероятно, катализируется не ЛАП, а другим ферментом (28). Приведенные выше субстраты применялись автором также для гистохимической локализации соответствующих ферментов в гистологических срезах тканей.

Определение активности трипептидазы по биуретовому методу, по London и сотр. (50), в модификации Haschen (37). Активность фермента определяют с глицил-глицил-глицином (ГГГ) в качестве субстрата, причем оптимум pH для этого пептида равняется 6,8. Принцип метода состоит в измерении разницы интенсивности окрашивания между медным комплексом ГГГ и медью и комплексами продуктов гидролиза этого трипептида.

Реактивы: 1) 0,05 М раствор ГГГ в 0,05 М вероналовом буфере с pH 6,8 служит субстратом. Конечная концентрация субстрата в инкубационной смеси составляет 0,025 М;

2) суспензия фосфорнокислой меди, приготовленная по Spies и Chambers (79a). Перед самым употреблением смешивают две части раствора хлористой меди с 1 частью трехзамещенного фосфата натрия;

3) боратно-натриевый буфер: 75,6 г $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 2 литрах воды и фильтруют;

4) депротеинизирующая смесь: смешивают равные части 20% трихлоруксусной кислоты и метанола.

Ход определения: 0,8 мл сыворотки доводят до pH 1 Н HCl (0,05 мл) и дополняют до объема 1 мл. В две пробирки с притертыми стеклянными пробками отмеривают по 0,25 мл субстрата и подогревают до температуры 38°. В одной из пробирок пускают в ход реакцию, приливая 0,25 мл сыворотки. По окончании инкубации прерывают реакцию, добавляя в обе пробирки смесь метанола и трихлоруксусной кислоты в количестве 0,5 мл. В контрольную пробирку прибавляют 0,25 мл сыворотки. Смешивают и ставят в водяную баню на 5 минут. Затем добавляют в каждую пробирку по 3 мл раствора бората и 1 мл суспензии фосфата меди, тщательно перемешанной. Перемешивают содержимое, три раза переворачивая пробирку, ставят на 5 минут в водяную баню и повторно перемешивают, нуту и колориметрируют пробирки со скоростью 2000 оборотов в минуту и колориметрируют против контрольной пробы с фильтром S_{53} , при толщине слоя гидролизованного субстрата, при помощи соответствующей стандартной кривой. Стандартная кривая составляют при тех же условиях, при которых проводилась ферментативная инкубация, причем смешивают в разных пропорциях (соответственно разной степени гидролиза субстрата) раствор 0,05 М глицил-глицил-глицина и 0,05 М растворы процента разложенного субстрата представляет собой прямую пока гидролиз не достигнет 25% ГГГ. Активность дипептидазы не препятствует определению, так как спектр поглощения и интенсивность окрашивания комплексов меди с глицил-глицином почти те же, что и для комплексов меди с глицином, образующимся при гидролизе дипептида.

Определение активности пептидаз по методу с нингидрином, по Schwartz и Engel (67). Этот метод использует предложенный Moor и Stein способ определения аминокислот при помощи реактива с нингидрином (53). Количество разложенного субстрата находят по стандартной кривой, составленной для смесей разного количества субстрата и продуктов его гидролиза. Экстинкция этих смесей (соответствующим разным степеням гидролиза субстрата), колориметрируемая против экстинкции, полученной при начальной концентрации субстрата (0% гидролиза) пропорциональна степени гидролиза субстрата.

Реактив Moor и Stein (53 или 54) должен быть свежеприготовленным. Для определения степени гидролиза субстрата, пробы инкубационной смеси вливают в 1% пикриновую кислоту, тормозящую дальнейшую ферментативную реакцию. Инкубационная смесь содержит буфер, сыворотку или другой источник фермента и субстрат, конечная концентрация которого должна составлять 25 μ молей в мл. Инкубационную смесь готовят в ледяной бане. В нулевой момент берут 0,2 мл смеси в посуду с 4,8 мл 1% пикриновой кислоты для получения начальной экстинкции смеси. Затем переносят инкубационную смесь в водяную баню с температурой 37° (небольшая ошибка за счет выравнивания температур), и после определенных сроков инкубации, берут по 0,2 мл смеси в посуду с 4,8 мл 1% пикриновой кислоты. Таким образом, 1 μ моль субстрата содержится, после осаждения белка, в 1 мл. Пробы центрифугируют, и с тремя порциями по 0,2 мл прозрачного раствора (что соответствует 0,2 μ моля) проводят параллельные реакции с нингидрином. Одновременно готовят по 3 слепые пробы с реактивами и 0,2 мл воды, 3 пробы стандарта с 40% гидролиза. Ко всем пробам добавляют по 1 мл реактива с нингидрином и подогревают в закупоренных пробирках в продолжение 20 минут в кипящей водяной бане. Охлаждают и разбавляют до 10 мл смесью спирта с водой в равных частях. Колориметрируют при 570 м μ . Пробы, содержащие стандарт с 0% гидролиза и 0-минутную инкубационную смесь колориметрируют против средней величины слепых проб с водой. Затем отсчитывают пробы со стандартом 40% гидролиза против средней величины стандартной пробы с 0% гидролиза, и наконец, колориметрируют остальные ферментативные пробы против 0-минутной инкубационной смеси. Процент гидролиза субстрата вычисляют, умножая среднюю экстинкцию каждой пробы на константу К, получаемую путем деления 40 на среднюю экстинкцию стандарта с 40% гидролиза.

Определение активности окситоциназы (ОТЦ) сыворотки по Müller-Hartburg, Nesvadba и Turpy (55). Принцип метода заключается в измерении количества β -нафтиламина, освобождаемого под влиянием сыворотки из субстрата L-цистинил-ди- β -нафтиламид.

Реактивы: 1) раствор субстрата готовят, растворяя 135 мг L-цистинил-ди- β -нафтиламида в 50 мл 0,012 Н НСl, легко подогревая и затем доводя объем раствора водой до 100 мл; 2) вероналовый буфер с рН 7,9: 68,9 мл 0,1 Н раствора вероната натрия и 31,1 мл 0,1 Н НСl разбавляют 50 мл воды; 3) 10% трихлоруксусная кислота; 4) 0,36 Н НСl; 5) 1% раствор NaNO_2 ; 6) 0,5% раствор сульфата аммония; 7) водный раствор дихлористоводородной соли N-(1-нафтил)-этилендиамина; 8) ацетон чистый для анализа.

Ход анализа: к 0,3 мл сыворотки прибавляют 0,45 мл воды и 1,5 мл вероналового буфера. Переносят по 0,75 мл этой смеси в две центрифужные пробирки и к обеим добавляют по 0,25 мл субстрата. Исследуемую пробу инкубируют в течение 4 часов при температуре 37°, а в контрольной пробе прерывают реакцию немедленно после добавления субстрата, путем введения 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Спустя 4 часа, таким же образом прерывают реакцию в инкубируемой пробе. Обе пробы центрифугируют и отмеривают 1 мл надосадочной жидкости в колбочки Эрленмейера емкостью в 50 мл. Добавляют 9 мл смеси, состоящей из 2 частей 0,36 Н НСl и одной части ацетона. Затем в темной комнате с красным светом добавляют в колбочки, через 3-минутные интервалы, 1 мл NaNO_2 , 1 мл сульфата аммония и наконец 1 мл N-(1-нафтил)-этилендиамина, тщательно помешивая. Ставят на 4 часа для инкубации при температуре 37° и колориметрируют при 565 мμ сравнивая с контрольными пробами. Количество β -нафтиламина находят по стандартной кривой, составленной в условиях метода при помощи чистого β -нафтиламина.

Активность фермента авторы выражают числом мг β -нафтиламина, освобожденного из субстрата под влиянием 100 мл сыворотки, в течение 1 часа. Эту величину они получают, умножая разность экстинкций на коэффициент 18,4.

Нормальная активность у небеременных женщин и у мужчин составляет 0,2, однако исследованный материал относительно невелик (14 женщин и 4 мужчин). Авторы отметили первое повышение активности ОТЦ по отношению к норме между 52 и 81 днем беременности. По мере прогресса беременности активность ОТЦ постепенно увеличивалась до 9 лунного месяца, когда она достигала в среднем 4,89. На 10 лунном месяце иногда наблюдается уменьшение активности ОТЦ, однако, в большинстве случаев, наибольшая активность фермента встречалась в родовом периоде. Она составляла, в среднем, 5,6 (2,81—7,4), т.е. была в 28 раз выше нормы. После родов, по мнению авторов, начинается постепенное падение активности ОТЦ; на 6 неделе она приближается к норме. Увеличение активности ОТЦ встречается также при болезнях печени. Приведенные данные подтверждаются польскими авторами (45).

При определении активности ОТЦ следует избегать гемолиза проб, так как эритроциты содержат аминопептидазу, разлагающую субстрат. Активность сыворотки не изменяется при комнатной температуре в течение 24 часов. В холодильнике ее можно хранить не менее 48 часов.

Определение активности γ -глутамилтранспептидазы (ГГТП) по методу Szewczuk и Orłowski с γ -DL-глутамил- α -аминопропионитрилом (83). Метод состоит в колориметрическом определении количества α -аминопропионитрила (АПН), освобожденного из субстрата γ -DL-глутамил- α -аминопропионитрила (γ -глу-АПН), под влиянием фермента.

Реактивы: 1) раствор субстрата: 100 мг γ -глу-АПН растворяют в 10 мл H_2O ; 2) буфер Tris 0,1 М с рН 8,8; 3) 10% трихлоруксусная кислота; 4) мышьяковистый натрий: 2 г мышьяковистого ангидрида растворяют в горячем виде в 100 мл 0,1 Н NaOH и охлаждают до комнатной температуры; 5) дистиллированная вода, насыщенная бромом; 6) раствор пиридина: 120 мл пиридина смешивают с 80 мл воды и добавляют, охлаждая, 20 мл концентрированной НСl; 7) раствор хлористоводородного бензида: 1,8 г чистого бензида растворяют, подогревая, в 50 мл 0,5 Н НСl и охлаждают. Употреблять свежий; 8) смесь бензида и пиридина: перед самым опытом смешивают 1 объем хлористоводородного бензида с 3 объемами раствора пиридина; 9) 0,01 М раствор HgCl_2 ; 10) 0,65 г KCN (свежий, для анализа, наивысшей чистоты) растворяют в 1000 мл

1 N NaOH. Перед самым употреблением раствор разбавляют точно до 0,0001 M раствора KCN.

Ход определения: в центрифужную пробирку отмеривают 0,25 мл буфера Tris и 0,2 мл субстрата. Подогревают до 37° и пускают в ход реакцию, добавляя 0,25 мл сыворотки. Через 120 минут инкубации прерывают реакцию 1,3 мл 10% трихлоруксусной кислоты. Одновременно готовят контрольную пробу с сывороткой, прибавляемой после трихлоруксусной кислоты. Отделяют белковый преципитат в центрифуге и переносят 1 мл прозрачной жидкости в пробирку с притертой стеклянной пробкой, емкостью в 10 мл, для определения АПН. Добавляют 0,1 мл 0,01 M HgCl_2 и 0,25 мл насыщенной бромной воды, закупоривают и ставят в водяную баню с температурой 37° на 3 часа. По истечении этого срока охлаждают пробирки, открывают и разлагают избыток брома прибавлением 0,25 мл мышьяковистого натрия. Струей воздуха удаляют пары брома из пробирки. Прибавляют 3,4 мл смеси пиридина и бензидина, перемешивают и ставят на 20 минут, до появления полного окрашивания. Колориметрируют пробы при 530 мμ, сравнивая с контролем. Количество освобождаемого во время ферментативной реакции АПН находят по стандартной кривой, составляемой при помощи KCN, так как было доказано (83), что чистый АПН дает в описанной реакции такие же величины, как равновесное количество KCN.

Для приготовления стандартной кривой отмеривают в ряд пробирок от 0,1 до 0,5 мл 0,0001 KCN, доводят их водой до объема 0,5 мл и прибавляют 0,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты. Затем добавляют 0,25 мл бромной воды, и спустя короткое время, устраняют избыток брома при помощи 0,25 мл арсенита. Вызывают цветную реакцию смесью пиридина и бензидина, как указывалось выше. Колориметрируют при 530 мμ.

Активность фермента выражают числом μмолей образующегося АПН в 100 мл сыворотки, в заданных условиях. В связи с неустойчивостью АПН в условиях опыта и его частичным разложением вводят корректирующий коэффициент 1,14.

Активность фермента в единицах $800 \times \mu\text{M KCN}$ (найденные по стандартной кривой) $\times 1,14$

Активность фермента в сыворотке здоровых лиц составляла в среднем 11 единиц. При хранении в течение 2 дней при комнатной температуре, или в течение недели при температуре 4° активность фермента в сыворотке не изменяется. Подогревание сыворотки в течение 5 минут, при температуре 65° уничтожает активность. Оптимум pH для данного субстрата находился между pH 8,5 и 8,7. Не обнаружено потери активности во время диализа сыворотки или лиофилизации.

Определение активности γ-глутамилтранспептидазы по методу Orłowski и Szewczuk (59) с γ-L-глутамил-α-нафтиламидом. Принцип метода состоит в определении количества α-нафтиламин (α-НА), освобождаемого во время ферментативной реакции из субстрата γ-L-глутамил-α-нафтиламида (γ-глу-α-НА) при помощи модифицированного процесса по Bratton и Marshall (13).

Реактивы: 1) буфер Tris с pH 9,0: 0,1 M раствор; 2) раствор субстрата. Растворяют, подогревая, 54,2 мг γ-глу-α-НА в 10 мл буфера Tris pH 9,0: 0,1 M (20 μM в мл). Употреблять свежий; 3) 25% трихлоруксусная кислота; 4) 0,1% NaNO_2 ; 5) 0,5% раствор сульфата аммония; 6) 0,05% раствор дихлористоводородной соли N-(1-нафтил)-этилендиамина в 95% этаноле.

Ход определения: в центрифужную пробирку отмеривают 0,5 мл субстрата, добавляют 0,25 мл воды, подогревают смесь до температуры 37° и пускают в ход реакцию, добавляя 0,25 мл сыворотки. Через 120 минут инкубации прерывают реакцию, добавляя 1 мл 25% трихлоруксусной кислоты. Одновременно готовят слепую пробу с сывороткой, прибавляемой после трихлоруксусной кислоты. Отделяют осажденный белок в центрифуге и 1 мл прозрачной надосадочной жидкости отмеривают в пробирку для определения α-НА. Добавляют 1 мл 0,1% NaNO_2 , затем через 3 минуты — 1 мл сульфата аммония, а через следующие 2 минуты — 2 мл дихлористоводородной соли N-(1-нафтил)-этилендиамина в этаноле. Ставят пробы в водяную баню с температурой 37° на 2 часа. По истечении этого срока колориметрируют пробы против слепых проб, при 560 мμ. Количество освобожденного α-НА находят по стандартной кривой, составленной при помощи шкалы от 0 до 0,2 M α-НА, в условиях метода.

Активность фермента выражают в единицах. 1 единица = 1 μM α-НА, освобождаемого в заданных условиях, в 100 мл сыворотки. У 34 здоровых лиц средняя активность фермента составляла 27,2 единицы. Описанный метод пригоден также для определения

активности фермента в человеческой моче, причем рекомендуется разбавлять мочу перед определением в пропорции 1 : 4. Активность в нормальной моче приблизительно в 4 раза выше, чем в сыворотке.

Активность фермента была по отношению к γ -L-глутамил- α -нафтиламиду приблизительно в 4 раза выше, чем по отношению к γ -глю- α -НА, однако, употребление этого субстрата затруднено вследствие его слабой растворимости. Синтез и свойства вещества, применяемого для определения γ -глутамилтранспептидазы описаны в оригинальной статье авторов (59).

ЛИТЕРАТУРА

1. Abderalden E., Hanson H.: *Fermentforschung* 1937, 15, 382. — 2. Adams E., Davis N. C., Smith E. L.: *J. Biol. Chem.* 1952, 199, 845. — 3. Albert Z., Orłowski M., Szewczuk A.: *Nature* 191, 767, 1961. — 4. Anson M. L.: *J. Gen. Physiol.* 1937, 20, 663. — 5. Anson M. L.: *J. Gen. Physiol.* 1937, 20, 777. — 6. Ball E. G., Revel J. P., Cooper O.: *J. Biol. Chem.* 1956, 221, 895. — 7. Barber V. T., Stern K., Askonas B. A., Cullen A. M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1948, 67, 421. — 8. Bergmann M., Zervas L., Schleich H., Leinert F.: *Z. physiol. Chem.* 1932, 212, 72. — 9. Bergmann M., Fruton J. S.: *J. Biol. Chem.* 1937, 117, 189. — 10. Bergmann M.: *Advances in Enzymol.* 1942, 2, 49.
11. Berger J., Johnson M. J., Baumann C. A.: *J. Biol. Chem.* 1941, 137, 389. — 12. Beller F. K., Gobelmann U.: *Klin. Wchsft.* 1958, 36, 1005. — 13. Bratton A. C., Marshall E. K. Jr.: *J. Biol. Chem.* 1939, 128, 537. — 14. Braun-Falco O., Salfeld K., Braun-Falco F.: *Klin. Wchsft.* 1959, 37, 231. — 15. Daugherty T. F., White A.: *Am. J. Anat.* 1945, 77, 81. — 16. Davis N. C., Smith E. L.: *J. Biol. Chem.* 1957, 224, 261. — 17. Dicker S. E., Tyler Ch.: *J. Obstetr. Gynaec. Brit. Emp.* 1956, 18, 690. — 18. Fekete K.: *Endokrinologie* 1930, 7, 1: 1932, 10, 16. — 19. Fleisher G. A.: *J. Biol. Chem.* 1953, 205, 925. — 20. Fleisher G. A.: *J. Biol. Chem.* 1954, 206, 637.
21. Fodor J., Miller A., Waelsch H.: *J. Biol. Chem.* 1953, 202, 551. — 22. Folk J. E., Gladner J. A.: *J. Biol. Chem.* 1958, 231, 379, 393. — 23. Fruton J. S.: *J. Biol. Chem.* 1946, 166, 721. — 24. Fruton J. S., Smith V. A., Driscoll P. E.: *J. Biol. Chem.* 1948, 173, 457. — 25. Fruton J. S.: *J. Biol. Chem.* 1946, 166, 721. — 26. Goldbarg J. A., Rutenburg A. M.: *Cancer* 11, 283, 1958. — 27. Goldbarg J. A., Pineda E. P., Rutenburg A. M.: *Am. J. Clin. Path.* 1959, 32, 571. — 28. Gomori G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954, 85, 570. — 29. Gomori G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1954, 87, 559. — 30. Grassmann W., Heyde W.: *Z. physiol. Chem.* 1929, 183, 32.
31. Grassmann W., Heyde W.: *Z. physiol. Chem.* 1930, 188, 69. — 32. Grassmann W., Dyckerhoff H., Schoenebeck O.: *Ber. dtsch. Chem. Ges.* 1929, 62, 1307. — 33. Green M. N., Kwan-Chung Tson, Bressler R., Seligman A. M.: *Arch. Biochem. Bioph.* 1955, 57, 458. — 34. Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A.: *Nature* 1950, 166, 288. — 35. Hanes C. S., Hird F. J. R., Isherwood F. A.: *Biochem. J.* 1952, 51, 25. — 36. Hansfeldt E.: *Z. physiol. Chem.* 1931, 194, 137. — 37. Haschen R. J.: *Clin. Chim. Acta* 1961, 6, 316. — 38. Haschen R. J.: *Clin. Chim. Acta* 1961, 6, 322. — 39. Haschen R. J.: *Clin. Chim. Acta* 1961, 6, 521. — 40. Hill R. L., Smith E. L.: *J. Biol. Chem.* 1957, 224, 209.
41. Hill R. L., Smith E. L.: *J. Biol. Chem.* 1958, 231, 117. — 42. Johnson M. J., Johnson G. H., Peterson W. H.: *J. Biol. Chem.* 1936, 116, 515. — 43. Keller P. J., Cohen E., Neurath H.: *J. Biol. Chem.* 1956, 223, 457. — 44. Kinoshita J. H., Ball E. G.: *J. Biol. Chem.* 1953, 200, 609. — 45. Klimek R., Pietrzycka M.: *Clin. Chim. Acta* 1961, 6, 326. — 46. Kowlessar O. D., Haeflner L. J., Steisenger M. H.: *J. Clin. Invest.* 1960, 39, 671. — 47. Linderstrom-Lang K.: *Z. physiol. Chem.* 1929, 182, 151. — 48. Linderstrom-Lang K.: *Z. physiol. Chem.* 1928, 173, 32. — 49. Lineweaver H., Burk D.: *J. Am. Chem. Soc.* 1934, 56, 658. — 50. London M., Fine A., Hudson P. B.: *Arch. Biochem. Bioph.* 1956, 64, 412.
51. Maschmann E.: *Biochem. Z.* 1941, 308, 359. — 52. Miller A. L., Worsley L.: *Brit. Med. J.* 1960, 1419. — 53. Moore S., Stein W. H.: *J. Biol. Chem.* 1948, 176, 367. — 54. Moore S., Stein W. H.: *J. Biol. Chem.* 1954, 211, 907. — 55. Müller-Hartburg W., Nesvadba H., Tuppy H.: *Arch. Gynak.* 1959, 191, 442. — 56. Neuman R. E., Smith E. L.: *J. Biol. Chem.* 1951, 191, 97. — 57. Opie E. L.: *Physiol. Rev.* 1922, 2, 552. — 58. Orłowski M., Szewczuk A.: *Clin. Chim. Acta* 1961, 6, 430. — 59. Orłowski M., Szewczuk A.: *Acta Biochim. Polon.* 1961, 8, 189. — 60. Page E. W.: *Amer. J. Obstetr.* 1946, 52, 1014.
61. Patterson J. W., Lazarow A.: *Methods of biochemical analysis*. Glick. D. Editor. New York. 1955, 2, 273. — 62. Pineda E. P., Goldbarg J. A., Banks B. M., Rutenburg A. M.: *Gastroenterology* 1960, 33, 698. — 63. Ravin H. A., Bernstein Ph., Seligman A. M.: *J. Biol. Chem.* 1954, 208, 1. — 64. Revel J. P., Ball E. G.: *J. Biol. Chem.* 1959, 234, 577. — 65. Riedel A., Wunsch E., Hartl A.: *Z. physiol. Chem.* 1959, 316, 61. — 66. Schwartz T. B., Engel F. L.: *J. Biol. Chem.* 1949, 179, 1047. — 67. Schwartz T. B., Engel F. L.: *J. Biol. Chem.* 1950, 184, 197. — 68. Schwartz T. B., Myers J. D.: *J. Clin. Invest.* 1954, 33, 337. — 69. Semm K.: *Klin. Wchsft.* 1955, 33, 817. — 70. Shippey S. S., Binkley F.: *J. Biol. Chem.* 1958, 230, 699.

71. Smith E. L., Cartwright G. E., Tyler F. H., Wintrobe M. M.: J. Biol. Chem. 1950, 185, 59. — 72. Smith E. L.: Advances in Enzymol. 1951, 12, 191. — 73. Smith E. L., Hill R. L.: Enzymes Vol. 4, 37. Academic Press 1960. — 74. Smith E. L., Spackman D. H.: J. Biol. Chem. 1955, 212, 271. — 75. Smith E. L., Polglase W. J.: J. Biol. Chem. 1949, 180, 1209. — 76. Smith E. L., Bergmann: J. Biol. Chem. 1944, 153, 627. — 77. Smith E. L.: J. Biol. Chem. 1948, 173, 553. — 78. Snoke J. E., Sohwert G. W., Neurath H.: J. Biol. Chem. 1948, 175, 5. — 79. Spackman D. H., Smith E. L., Brown D. M.: J. Biol. Chem. 1955, 212, 255. — 79a. Spies J. R., Chamber D. C., J. Biol. Chem. 1951, 191, 787. — 80. Sullivan M. X., Hess W. C.: J. Biol. Chem. 1936, 116, 221.

81. Szczeklik E., Orłowski M., Szewczuk A.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 503. — 82. Szczeklik E., Orłowski M., Szewczuk A.: Gastroenterology 1961, 41, 353. — 83. Szewczuk A., Orłowski M.: Clin. Chim. Acta. 1960, 5, 680. — 84. Tuppy H., Nesvadba H.: Mh. Chem. 1957, 88, 977. — 85. Valee B. L., Neurath H.: J. Biol. Chem. 1955, 217, 253. — 86. Van Slyke D. D.: Ber. dtsch. chem. Ges. 1910, 43, 3170. — 87. Weil L., Russel M. A.: J. Biol. Chem. 1938, 126, 245. — 88. Werle E., Effkemann: Arch. Gynak. 1941, 171, 286. — 89. Werle E., Hevelke A., Buthmann K.: Biochem. Z. 1941, 309, 270. — 90. Werle E., Semm K., Enzenbach R.: Arch. Gynak. 1950, 177, 211.

91. Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E.: Ber. dtsch. chem. Ges. 1921, 54, 2988. — 92. Zamecnik P. C., Stephenson M. L., Cope O.: J. Biol. Chem. 1945, 158, 135.

ТРАНСАМИНАЗЫ (АМИНОФЕРАЗЫ) И ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ ОБМЕНА АМИНОКИСЛОТ

KORNEL GIBIŃSKI

Не подлежит сомнению, что среди различных ферментов, связанных с обменом аминокислот и белков, особый интерес для клиники представляют трансаминазы. Это ферменты, которые способствуют обратимому переносу группы NH_2 с аминокислот на кетокислоты. В результате реакции первоначальная аминокислота превращается в кетокислоту, а входящая в реакцию кетокислота превращается в аминокислоту. Needham (19) первая обратила внимание на то, что глутаминовая кислота исчезает при смешивании ее с размельченными мышцами голубя, причем не удается обнаружить образования аммиака. Уже этот автор высказала предположение, что аминная группа присоединилась к другому соединению, образуемому вероятно в процессе углеводного обмена. Это предположение несколько лет спустя подтвердили Braunstein и Kritzmann (2). Они установили, что глутаминовая кислота исчезает из мышечной кашицы в присутствии пировиноградной кислоты, причем образуется аланин. Первоначально предложенный этими авторами термин для соответствующего фермента, „аминофераза“, сохранился до настоящего времени, хотя в клинической литературе гораздо чаще в настоящее время встречается название „трансаминаза“.

Процессы переаминирования, стоящие на границе белкового и углеводного обмена, очень распространены в мире растений, бактерий и животных. Известно много различных трансаминаз, которые определяют по конечным продуктам, образующимся в результате реакций, в которых трансаминазы служили катализаторами. Так говорят о глутамино-щавелевоуксусной трансаминазе (итальянские авторы охотней называют ее по продуктам другой половины реакции — аспарагино-кетоглутаровой трансаминазой), глутамино-пировиноградной трансаминазе (или аланино-кетоглутаровой), тирозин-кетоглутаровой, фенилаланин-кетоглутаровой, лейцин-кетоглутаровой, орнитин-кетоглутаровой и так далее. Главной осью, вокруг которой происходят процессы переаминирования в тканях, является α -кетоглутаровая кислота, та самая, которая играет очень важную роль в лимоннокислом цикле. Она является акцептором аминных групп от различных аминокислот, причем сама превращается в L-глутаминовую кислоту. Возможность обратимого переаминирования, существу-

ющая во всех органах, позволяет на ходу выравнивать концентрацию аминокислот и α -кетокислот согласно потребностям. Именно этот путь дезаминирования аминокислот является особенно важным, так как из всех L-аминокислот только L-глутаминовая кислота встречается в тканях обилие соответствующего фермента (L-глутамат-дегидрогеназы), способного к дезаминированию ее в α -кетоглутаровую кислоту. В этом процессе выделяется аммиак, который обезвреживается в процессе метаболизма в мочевины. Этот путь образования мочевины, является главным путем удаления азота и одним из наилучших регуляторов азотного равновесия в организме. Если уровень аминокислот в тканях превосходит уровень, который вытекал бы из нормального равновесия между средой и тканевыми белками, концентрация α -кетоглутаровой кислоты, а следовательно и щавелевоуксусной и пировиноградной кислот падает при одновременном росте концентрации L-глутаминовой кислоты. Наоборот, если уровень других аминокислот не достигает необходимого уровня белково-гуморального равновесия, компенсаторный механизм трансаминирования обуславливает возвращение к норме их концентрации за счет L-глутаминовой кислоты (20). Роль глутаминовой кислоты и глутамина особенно демонстративна в белковом обмене мозговой ткани. Эти соединения составляют 40—80% аминового азота (небелкового) мозга, что значительно превышает содержание их в других органах. Мозговая ткань обладает комплексом ферментов (глутамат-дегидразой, глутамат-трансаминазой, глутамат-декарбоксилазой и глутаминазой), целью которых является удаление из клеток освободившегося аммиака. Аммиак обладает высокой токсичностью по отношению к центральной нервной системе. В физиологических условиях в мозговой ткани он практически не обнаруживается, после смерти же количество его растет очень быстро (7).

С самого начала биохимиков занимал вопрос, все ли процессы переаминирования, независимо от субстрата, входящего в реакцию, происходят при воздействии одного и того же фермента, или же существуют различные ферменты, специфические по отношению к субстрату. На своеобразие различных трансаминаз указывают опыты с фракционированием ферментов, полученных из микробов, в которых обнаружено, что одна фракция ферментов катализирует переаминирование только глутаминовой, аспарагиновой, фенилаланиновой кислоты, тирозина и триптофана, тогда, как другая выполняет эту роль только для ванилина, аланина и α -амино-бутировой кислоты (17).

С другой стороны установлено, что та же самая SGOT из печени собаки встречается в виде двух, несколько отличных в физикохимическом отношении разновидностей (11). Это явление, называемое изозимией, иногда служит для установления источника трансаминаз: происходят ли они из печени, или из сердца. В приведенном выше примере двух разновидностей трансаминаз печени собаки, можно предполагать, что одна разновидность происходит из протоплазмы, а другая — из митохондрий.

Изменялись также взгляды на значение и распространение процессов переаминирования в живом организме. Вначале считалось что эта реакция является общей для всех аминокислот. Со временем, однако, установили, что она касается прежде всего аспарагиновой, глутаминовой кислоты и аланина, и лишь в немногих случаях — других аминокислот. Причем степень переаминирования и темп этих реакций для последних аминокислот настолько незначительны, что можно сомневаться, играют ли они какую либо роль в промежуточном обмене (6, 11).

Существование процессов переаминирования установлено почти во всех тканях и органах животных, причем содержание трансаминаз в различных органах отличается в значительной степени.

Таблица 8

Содержание GOT и GPT в 1 г ткани, выраженное
в тысячах единиц Karmen (F. Wróblewski, J. S. La Due)

	GOT	GPT
Сердце	156	7,1
Печень	142	44
Скелетная мышца	99	4,8
Почка	91	19
Поджелудочная железа	28	2
Селезенка	14	1,2
Легкое	10	0,7

Как видно, больше всего трансаминаз содержит сердце, печень, скелетные мышцы и почки. Большим количеством вероятно также отличаются тромбоциты (15).

Методы определения трансаминаз настолько точны, что анализ нескольких проб того же самого материала, произведенный в той же лаборатории, дает очень близкие результаты. Однако содержание фермента в том же органе у двух разных лиц может значительно отличаться (1).

Кроме того, результаты анализов, выраженные в различных единицах, колеблются в широких границах и иногда, несравнимы. Из данных многих авторов следует, что различия в содержании GOT и GPT в сердце и в печени, не так велики, как это указано в таблице 8. Однако следует обратить внимание на то, что при всех сопоставлениях количество GOT превосходит GPT, и на то, что в печени этих ферментов содержится больше, чем в сердце. Это явление до некоторой степени отражает тот факт, что индекс SGOT/SGPT у здоровых превышает 1, а также то, что наиболее высокие величины трансаминазы в крови встречается при заболеваниях паренхимы печени.

Чтобы понять сложность явлений, которые кроются за определением трансаминазной активности плазмы крови, следует иметь в виду, что энзиматическая функция обусловлена многими факторами, например, она иначе протекает в тканевой кашице, чем в сыворотке. Ферменты, проникнувшие в плазму, чаще всего лишены коферментов, то есть не активны. Коферментами трансаминазы глутаминовой кислоты являются производные витамина B₆, а именно, фосфат пиридоксала и фосфат пиридоксамина. О значении витамина B₆ для этой ферментной системы свидетельствуют эксперименты, в которых введение этого витамина обезьянам и людям увеличивает активность трансаминазы, а прекращение введения — снижает (16, 18, 17).

Для клинических целей производится исследование почти исключительно GOT и GPT, схему реакций которых представляет рисунок 29.

Эти ферменты находятся в жидкой части клеток и не связаны с образованиями протоплазмы. Поэтому в случае повреждения структуры клеток они легко проникают в тканевую жидкость и в кровь, где их можно легко обнаружить.

Кровь для исследования берут из вены, причем для исследования можно пользоваться как сывороткой, так и плазмой. В последнем случае кровь смешивают с антикоагулянтом. В качестве антикоагулянта может служить щавелевокислый или лимоннокислый натрий, или гепарин. Из исследований Karmen, Wróblewski и La Due (12), подтвержденных в лаборатории нашей клиники, вытекает, что ни один из этих антикоагулянтов не изменяет заметным образом активности трансаминаз.

Эритроциты содержат гораздо больше ферментов, чем плазма, поэтому гемолизированная кровь обладает в 10 раз более высокой активностью GOT и в 3 раза GPT, чем плазма (12). Этим вероятно объясняется тот факт, что при исследовании трансаминазы в сыворотке, которая была отделена от эритроцитов после того, как кровь хранилась несколько дней, получают ложно высокие величины.

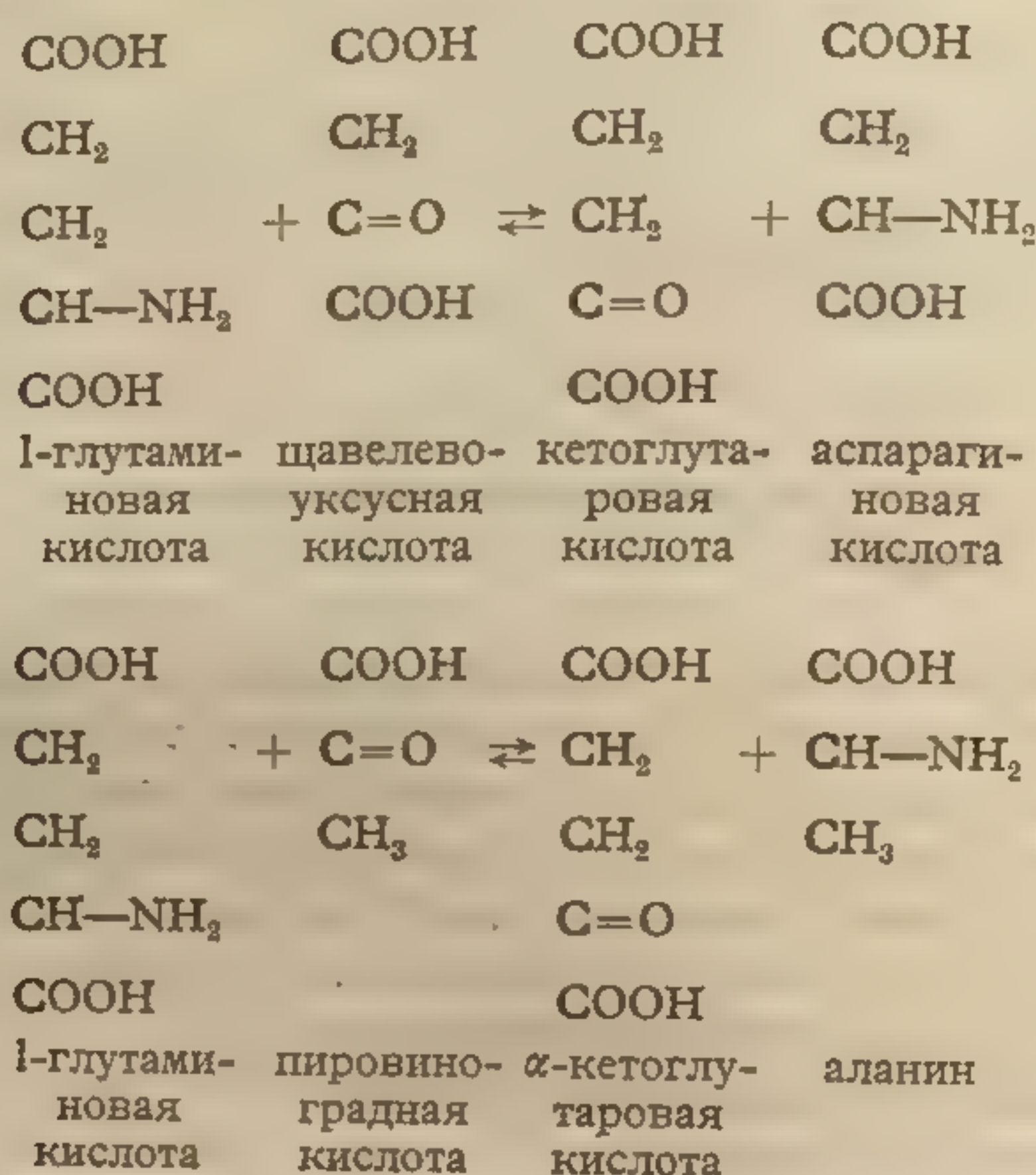


Рис. 29. Схема действия аспартат-аминотрансферазы (глутаминощавелевоуксусной трансаминазы) и аланин-аминотрансферазы (глутаминопировиноградной трансаминазы).

До настоящего времени не удалось обнаружить полного отсутствия трансаминазы в крови у здоровых и больных людей при различных заболеваниях.

При хранении сыворотки при температуре 0—5° в течение 2 недель ферментная активность ее не падает, а при комнатной температуре при той же длительности хранения снижается в 2 раза. Подогревание сыворотки до температуры 56°С в течение 5 минут не оказывает действия, но при кипячении в течение 10 минут при температуре 100° фермент теряет 90% своей активности. Замораживание и лиофилизация не влияют на активность фермента.

Активность трансаминазы в моче очень низкая, а в желчи очень высокая, что указывает на путь удаления фермента. Оптимум реакции отмечается при pH = 7,8; во время инкубации pH незначительно увеличивается.

Ниже приводим описание нескольких способов определения активности трансаминаз. Этих способов и их модификаций имеется гораздо больше. Приводим лишь те, которые считаем наиболее применимыми для клинических целей. Поэтому опускаем очень трудоемкую и длительную хроматографическую методику Кармен и сотрудников (12), хотя эта методика была одной из первых, примененных в клинике (также и нами). Опускаем также манометрическую методику, основанную на измерении CO₂, освобожденного из глутаминовой кислоты ее декарбоксилазой, и спектрофотометрическую методику, ввиду высокой стоимости необходимых реактивов. Ограничимся описанием трех колориметрических методов.

Как мы уже указывали, способы, основанные на разных принципах, дают результаты, выраженные в разных единицах. В клинической литературе постепенно исчезает (хоть с точки зрения химии это неправильно) выражение

активности трансаминаз в молях появляющегося или исчезающего метаболита. Эту активность чаще всего выражают в спектрофотометрических единицах, в которые легко перевести данные обычных фотометрических определений. В одной из первых работ на людях Wróblewski и La Due (28), исследовав 500 здоровых людей, обнаружили, что активность SGOT колеблется у них в пределах 5—40 единиц со средней 22,1 единицы, что и принято за норму. Для SGPT эта средняя величина составляет 16 единиц. Некоторые авторы принимают за верхнюю границу нормы 40—50 единиц, другие 45 единиц (13). В наших работах (8, 9) мы уже довольно давно приняли за верхнюю границу нормы 50 единиц. Как вытекает из приведенных в последнее время расчетов Gray (10), патологическими можно считать лишь величины, превышающие 60 единиц. Тот же автор указывает, что соответствие между спектрофотометрическими и колориметрическими единицами отмечается лишь до значений 120 единиц. Если, наконец, принять во внимание, что разные авторы применяют разные концентрации субстрата (разница бывает даже пятикратной), а максимальная активность фермента зависит от концентрации субстрата, а также то, что в публикациях еще до настоящего времени употребляется обозначение активности ферментов в μ молях или μ граммах метаболита, миллилитрах (CO_2), единицах Katmen или Feldman и Gunsalus, станет понятной острая необходимость международной стандартизации в этой области (11).

Наконец следует помнить, что активность трансаминазы плазмы не зависит от пола и возраста. Из этого последнего правила существует маленькое исключение. А именно, установлено, что у здоровых новорожденных верхняя граница нормы может достигать 120 единиц SGOT и 90 единиц SGPT (13, 14, 26). При этом не отмечается взаимозависимости между активностью трансаминазы в крови матери и в крови новорожденных, определенной одновременно (5).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРАНСАМИНАЗ

Определение аспартат-аминотрансферазы и аланин-аминотрансферазы по S. Reitman и S. Fränkel (24).

Принцип. Образующиеся во время реакции трансаминирования кетокислоты определяют в виде фенилгидразонов, дающих в щелочной среде красное окрашивание.

Реактивы:

- 1) 0,1 М раствор фосфатного буфера с pH 7,4
 - а) 35,82 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ растворяют, доливая воды до 1000 мл,
 - б) 13,61 г KH_2PO_4 растворяют, доливая воды до 1000 мл. Буферный раствор приготавливают, смешивая 420 мл раствора а) с 80 мл раствора б).
- 2) субстрат для определения аспартат-аминотрансферазы: 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 2,66 г DL-аспарагиновой кислоты растворяют примерно в 19 мл 1Н NaOH, доводя pH до 7,4 (под контролем pH-метра) и дополняют фосфатным буфером до 100 мл. Этот раствор до момента употребления хранят в замороженном виде;
- 3) субстрат для определения аланин-аминотрансферазы 29,2 мг α -кетоглутаровой кислоты и 1,79 г DL- α -аланина растворяют в 1Н растворе едкого натра, доводя pH до 7,4, после чего дополняют фосфатным буфером до 100 мл. Этот раствор сохраняют в замороженном виде до момента употребления;
- 4) стандартный раствор пировиноградного натрия. 22 мг пировиноградного натрия растворяют в 100 мл фосфатного буфера с pH 7,4. 1 мл этого раствора содержит 2 μ моля пировиноградного натрия;
- 5) раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 19,8 мл этого вещества растворяют в 100 мл 1Н соляной кислоты. Этот раствор следует хранить в темноте;
- 6) 0,4 Н раствор едкого натра.

Ход анализа: в 2 пробирки вносят по 0,5 мл соответствующего субстрата, затем подогревают в течение 10 минут при температуре 40° , после чего прибавляют 0,1 мл сыво-

ротки (без следов гемолиза) или плазмы. Содержимое пробирок инкубируют при температуре 40°С в течение 60 минут для определения SGOT и 30 минут для определения SGPT. После окончания инкубации к каждой пробирке прибавляют по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и после смешивания ждут 20 минут. Контрольная проба состоит из 0,1 мл сыворотки, 0,5 мл соответствующего субстрата и 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразина. Контрольную пробу не инкубируют. Появляющееся окрашивание колориметрируют в фотометре Пульфриха при фильтре S_{49} в кюветах толщиной 1 см. Коэффициент экстинкции определяют по стандартной кривой. Если активность трансаминаз превышает 100 единиц, то анализ повторяют с различными разведениями сыворотки.

Приготовление стандартной кривой: в 4 пробирки по очереди прибавляют 1,0, 0,9, 0,8 и 0,7 мл субстрата GOT, а затем 0, 0,1, 0,2 и 0,3 мл раствора пировиноградного натрия. В каждую пробирку прибавляют 0,2 мл дистиллированной воды и 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина. Содержимое пробирок смешивают. Через 20 минут в каждую пробирку прибавляют по 10 мл 0,4N NaOH. Колориметрирование производят ровно через 30 минут. Пробирка, не содержащая раствора пировиноградного натрия, соответствует 0 единицам активности SGOT и SGPT; пробирка, содержащая 0,1 мл пировиноградного натрия соответствует 21 единицам SGOT и 24 единицам SGPT, содержащая 0,2 мл — 55 единицам SGOT и 52 единицам SGPT, а 0,3 мл раствора пировиноградного натрия соответствует 102 единицам SGOT и 87 единицам SGPT.

В III Клинике Внутренних Болезней в Бытоми не приготавливают эталонной кривой. Колориметрическое определение производят при S_{53} фотометра Пульфриха в кюветах толщиной 2 см. Полученные коэффициенты экстинкции для SGPT умножают на 400, а для SGOT на 200. В наших условиях нормальная активность SGPT и SGOT не превышает 60 единиц. При коэффициенте экстинкции, превышающем 0,45, следует сыворотку или плазму развести в 5—10 раз.

Определение активности SGOT по P. Cabaud, R. Leeper, F. Wróblewski (4).

Принцип: образующуюся во время трансаминирования щавелевоуксусную кислоту определяют количественно после предварительного превращения в пировиноградную кислоту. Эту последнюю определяют количественно в виде гидразона.

Реактивы:

1) приготовление субстрата: 2,66 г аспарагиновой кислоты + 2 г однозамещенного фосфата калия + 0,6 г α -кетоглутаровой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды, а затем при помощи едкого кали доводят pH до 7,4;

2) трихлоруксусная кислота: 100 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 мл воды;

3) раствор лимоннокислого анилина: 50 г лимонной кислоты растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Перед употреблением к 5 мл анилина прибавляют 5 мл вышеуказанного раствора лимонной кислоты;

4) раствор 2,4-динитрофенилгидразина: 100 мг этого вещества растворяют в 20 мл концентрированной соляной кислоты, после чего прибавляют 80 мл дистиллированной воды;

5) чистый толуол;

6) спиртовой раствор едкого кали: 2,5 г кристаллического едкого кали растворяют в 100 мл 95% этилового спирта. Этот раствор приготавливают по крайней мере накануне проведения анализа. Появляющиеся иногда хлопья следует удалить фильтрованием;

7) стандартный раствор пировиноградного натрия: 0,110 г пировиноградного натрия растворяют в 100 мл воды. 1 мл этого раствора содержит 1 мг пировиноградной кислоты.

Ход анализа: в 2 пробирки вносят по одному мл субстрата и одному мл сыворотки. Затем в одну из них прибавляют 2 капли лимоннокислого анилина. Вторую пробирку инкубируют в течение 20 минут при температуре 26°С, после чего в нее также прибавляют 2 капли трихлоруксусной кислоты и 2 капли лимоннокислого анилина. Содержимое пробирок смешивают и оставляют на 20 минут. По истечении этого времени в обе пробирки прибавляют по 1 мл динитрофенилгидразина, а через 5 минут после этого по 4 мл толуола. Содержимое пробирок энергично встряхивают в течение 2 минут и центрифугируют. Отливают 2 мл толуолового слоя в другие пробирки, после чего в эти пробирки прибавляют по 6 мл спиртового раствора едкого кали. Интенсивность появившегося окрашивания определяют при фильтрах S_{49} в кюветах толщиной 1 или 2 см в сравнении со слепой пробой (неинкубированной).

Приготовление стандартной кривой: из запасного раствора, содержащего 1 мг пировиноградной кислоты в 1 мл раствора приготавливают разведения с таким расчетом,

чтобы 1 мл раствора содержал от 1 до 500 мкг пировиноградной кислоты. Полученные таким образом вторичные образцы проводят через все этапы, как и сыворотку. Полученные экстинкции наносят на оси координат и таким образом получают стандартную кривую. При описанной методике 1 мкг пировиноградной кислоты соответствует одной единице активности SGOT.

Определение SGPT по F. Wróblewski и P. Cabaud (29).

Принцип: образующуюся в процессе трансаминирования пировиноградную кислоту определяют колориметрически в виде гидразона.

Реактивы:

- 1) субстрат: 1,78 г DL- α -аланина + 2 г однозамещенного фосфата калия + 0,6 г α -кетоглutarовой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды, pH этого раствора доводят до 7,4 при помощи разведенного раствора KOH;
- 2) раствор трихлоруксусной кислоты: 100 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды;
- 3) реактив 2,4-динитрофенилгидразина: 100 мг 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 20 мл концентрированной HCl, после чего прибавляют 80 мл дистиллированной воды;
- 4) чистый толуол;
- 5) спиртовой раствор KOH: 2,5 г KOH растворяют в 100 мл 95% этилового спирта;
- 6) стандартный раствор пировиноградной кислоты: 0,110 г пировиноградного натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 1 мл этого раствора содержит 1000 мкг пировиноградной кислоты. Из этого раствора приготавливают дальнейшие разведения пировиноградной кислоты таким образом, чтобы в 1 мл раствора содержалось от 1 до 500 мкг этого вещества.

Ход анализа: в 2 пробирки наливают по 0,5 мл дистиллированной воды и 0,5 мл сыворотки. Затем в обе пробирки прибавляют по 0,5 мл субстрата. Одну из пробирок инкубируют в течение 20 минут при температуре 26°, в другую же немедленно прибавляют 1 каплю приготовленного раствора трихлоруксусной кислоты. После инкубации к опытной и контрольной пробе прибавляют по 0,5 мл реактива динитрофенилгидразина и через 5 минут по 2 мл толуола. Энергично встряхивают и центрифугируют. 1 мл толуолового слоя переносят в пустые пробирки и прибавляют 3 мл спиртового раствора KOH. Интенсивность окраски определяют в колориметре при длине волны 490 мμ.

Стандартную кривую приготавливают следующим образом: 0,5 мл вторичных эталонов (содержащих от 1 до 500 микрограмм пировиноградной кислоты в 1 мл) подвергают всем процедурам, что и опытную пробу. Из полученных коэффициентов экстинкции вычерчивают стандартную кривую.

В качестве единицы принята та активность трансаминазы, содержащейся в 1 мл сыворотки, которая в условиях описанной методики образует 1 мкг пировиноградной кислоты. Одна колориметрическая единица равна 1—2 спектрофотометрическим единицам. В диапазоне нормальной активности трансаминазы одна колориметрическая единица соответствует одной спектрофотометрической, а в диапазоне патологической активности — двум единицам.

ФЕРМЕНТЫ ОРНИТИНОВОГО ЦИКЛА

На рисунке 30 приведена схема этого цикла образования мочевины.

Наиболее интересен фермент орнитин-карбамоил-трансфераза, катализирующая первый этап этого цикла, то есть образование цитрулина из орнитина. Эта реакция протекает избирательно в печени и в случае поражения этого органа активность фермента в крови увеличивается. Это явление используется для ферментологической диагностики заболеваний печени. В желудке, тонком кишечнике и слепой кишке обнаружены следы этого фермента, не превосходящие у собак 1,5% (22), а в кишечнике человека, по другим данным, (23) — 10% количества его в печени.

В крови у здоровых людей количество этого фермента ничтожно, или же его вообще не удается обнаружить.

Для аналитических целей используется тот факт, что орнитин-карбамоил-трансфераза, которая с одной стороны способствует биосинтезу цитрулина, может также и разлагать его. Эта последняя реакция происходит в присут-

ствии фосфатов или арсенатов. Продукт обратного распада цитрулина, арсенат карбамоила, самопроизвольно разлагается до перекиси водорода, аммиака и арсената. Эти конечные продукты распада служат для определения активности фермента 1) путем измерения радиоактивности выделенного CO_2 , углерод которого происходит из группы карбамоилового цитрулина, меченого C^{14} , или 2) способом Конвея микродиффузии аммиака, образующегося при арсенолизе цитрулина. Приводим методику микродиффузии Reichard (24) в модификации Ballan.

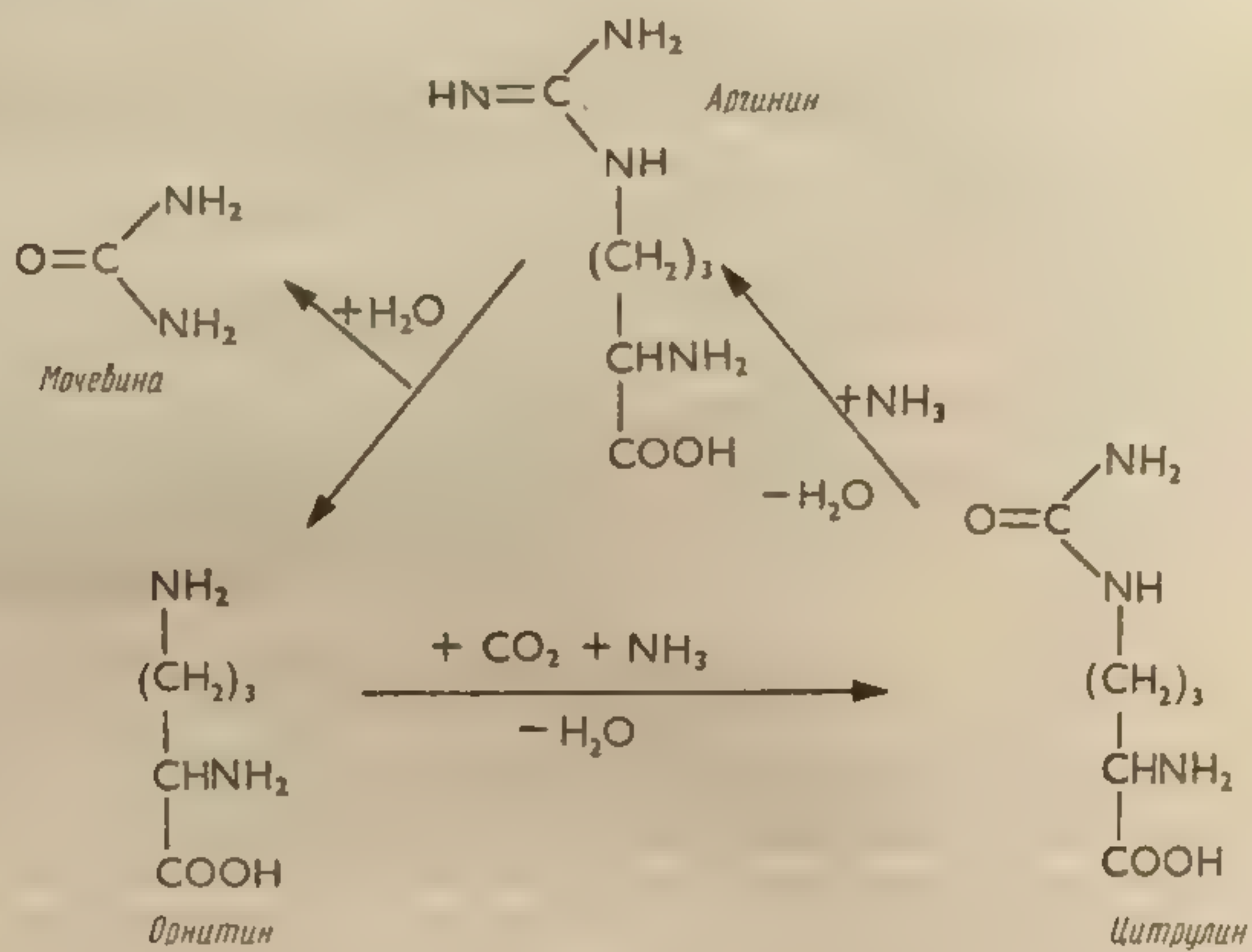


Рис. 30.

Реактивы:

- 1) арсенат натрия 0,5 М, рН 7,15 (15,6 г $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл воды и при помощи HCl доводят до соответствующего рН);
- 2) 350 мг DL-цитрулина растворяют в 10 мл приведенного выше буфера;
- 3) 4Н раствор хлорной кислоты (3,5 мл хлорной кислоты $d = 1,61$, доливают водой до 100 мл);
- 4) насыщенный раствор углекислого калия ($\text{K}_2\text{CO}_3 \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$) и двууглекислого калия в отношении 2:1;
- 5) H_2SO_4 0,01Н;
- 6) реактив Nessler: растворяют 45,5 г HgI_2 и 34,9 г KJ по возможности в небольшом количестве воды. Прибавляют 112 г KOH , растворенного в 140 мл воды. Доливают водой до 1 литра. Оставляют стоять на 3 дня;
- 7) стандарт аммиака: 1,416 г нейтрального сернокислого аммония растворяют в 1 л воды. В день употребления разводят в отношении 1/100. В 1 мл имеется 3 μg NH_3 как Н.

Ход анализа: в пробирку отмеривают 1 мл сыворотки и 1 мл субстрата цитрулина. Пробирку закрывают и ставят на 24 часа в водяную баню (при температуре 37°C). Слепая проба: к 1 мл сыворотки прибавляют 1 мл арсенатного буфера и в дальнейшем поступают так же, как и с опытной пробой. Через 24 часа в обе пробирки прибавляют по 0,2 мл раствора хлорной кислоты и центрифугируют. Во внутренний цилиндр чашки Конвея наливают 1,5 мл раствора серной кислоты, а в наружный 1,1 мл отцентрифугированной жидкости (соответствует 0,5 мл сыворотки) и 2 мл насыщенного раствора углекислого и двууглекислого калия. Чашку немедленно закрывают герметически крышкой и оставляют в водяной бане в течение 1 часа при температуре 37°C . В течение этого времени чашки Конвея слегка встряхивают. Затем во внутренний цилиндр прибавляют четыре капли реактива Nessler и 1,3 мл дистиллированной воды. После этого содержимое внутреннего цилиндра переносят в кювету и в спектрофотометре определяют экстинкцию при длине волны 400 μm . От экстинкции опытной пробы отнимают экстинкцию слепой пробы и результат наносят на кривую, полученную при измерении экстинкции стандартных растворов (которые подвергают тем же манипуляциям, что и пробу).

Норма: 0 до 4 μ г Н аммиака/0,5 мл сыворотки = 0,28 μ М Н/0,5 мл сыворотки.
Методика Brown и Grisoli (3). Это методика определения активности орнитин-карбамоил-трансферазы в сыворотке, путем определения количества образующегося под влиянием этого фермента цитрулина из карбамоилфосфата и орнитина. Количество образующегося цитрулина определяют колориметрически по способу Archibald. Мочевину, которая может мешать при измерении, разлагают при помощи уреазы.

Реактивы:

- 1) 0,1 М фосфатный буфер с рН 7,0;
- 2) 100 М двулитиевого карбамоилфосфата и 20 мг уреазы, растворенные непосредственно перед употреблением в 10 мл вышеприведенного буфера (1);
- 3) 0,05 М раствор L-орнитина;
- 4) 1Н хлорная кислота;
- 5) 3% раствор диацетилмоноксима;
- 6) смесь H_2SO_4 и H_3PO_4 в отношении 3:1

Ход исследования: к 1 мл раствора карбамоилфосфата и уреазы (2) прибавляют 1 мл L-орнитина (3) и 2 мл сыворотки. В качестве слепой пробы служат пробирки, не содержащие орнитина или сыворотки. После смешивания содержимое пробирок инкубируют в течение 15 минут при температуре 37°C, а затем удаляют белок, для чего прибавляют 4 мл раствора хлорной кислоты и центрифугируют в течение 10 минут при 200 xg, при температуре 0°C. 2 мл жидкости над осадком разводят до 5 мл и прибавляют 2 мл смеси серной и фосфорной кислот (6) и 0,25 мл раствора диацетилмоноксима (5). Пробирки закрывают пробками, снабженными капиллярными трубками, и ставят на 15 минут в кипящую водяную баню (без доступа света). После охлаждения определяют экстинкцию при длине волны 480 м μ . Количество образовавшегося цитрулина рассчитывают по разнице между экстинкцией опытной и слепой пробы, пользуясь кривой, составленной при измерении экстинкции различной концентрации цитрулина. Пользование кривой неизбежно, так как изменение абсорбции не подчиняется закону Вебера.

За верхнюю границу нормы принимают 0,30 μ М цитрулина, образованного 1 мл сыворотки.

Аргиназа, называемая также аргининамидазой, имеется в большой концентрации в печени. В приведенной выше схеме она катализирует распад аргинина до орнитина и аммиака. Ввиду методических трудностей, определение этого фермента, хотя он хорошо изучен, не нашло распространения в клинических лабораториях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Avapara J., Seale B.: J. Biol. Chem. 1952, 194, 497. — 2. Braunstein A. E., Kritzmman M. G.: Enzymologia 1937, 2, 129. — 3. Brown R. W., Grisoli S.: J. Lab. Clin. Med. 1959, 54, 617. — 4. Cabaud P., Leeper R., Wróblewski F.: Am. J. Clin. Pathol.; 1956, 26, 1101. — 5. Cekański A., Kokot F.: Ginekologia Polska 1961, 32, 565. — 6. Cohen P., Hekhuis G.: J. Biol. Chem.; 1941, 140, 711. — 7. Fayeau F., Neuzil E.: Biochimie pathologique du système nerveux, в М. Polonovski, Pathologie Clinique. T. II. Masson et Cie; Paris 1952. — 8. Gibiński K.: Pol. Tyg. Lek.; 1958, 13, 831. — 9. Gibiński K., Giec L., Kokot F.: Przegl. Lek.; 1958, 14, 290. — 10. Gray C. H.: Problems of interpretation in clinical enzymology. Europejskie Sympozjum Enzymologii Lekarskiej Milano, 28—29 marzec 1960. — 11. Henley K. S., Schmidt E., Schmidt F. W.: J. A. M. A.; 1960, 174, 977. — 12. Karmen A., Wróblewski F., La Due J. S.: J. Clin. Investig.; 1955, 34, 126. — 13. Kove S., Goldstein S., Wróblewski F.: Pediatrics 1957, 20, 590. — 14. Kove S., Goldstein S., Wróblewski F.: Pediatrics, 1957, 20, 584. — 15. Magalini S. J., Stefanini M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1956, 93, 13. — 16. Marsh M. E., Greenberg L. D., Rinehart J. F., Nutrition J.; 1955, 56, 119. — 17. Meister A.: Science 1954, 120, 43. — 18. Meister A., Dawney P. F.: Proc. Roy. Soc. Exp. Biol. Med.; 1956, 91, 1. — 19. Needham D. M.: Biochem. J. 1930, 24, 208. — 20. Polonovski M.: Vue d'ensemble sur le métabolisme intermédiaire, M. Polonovski, Pathologie Clinique T. II, 24, Masson et Cie., Paris, 1952. — 21. Reichard H.: J. Lab. Clin. Med.; 1959, 53, 417. — 22. Reichard H.: J. Lab. Clin. Med.; 1960, 56, 218. — 23. Reichard H., Reichard P.: J. Lab. Clin. Med.; 1958, 52, 709. — 24. Reitman S., Frankel S.: Am. J. Clin. Pathol.; 1957, 28, 56. — 25. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: Recenti Progressi in Med.; 1956, 20, 533. — 26. Samochowiec L., Wawrzyk R., Samochowiec E.: Pol. Tyg. Lek.; 1959, 14, 1053. — 27. Wróblewski F., La Due J. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1956, 91, 569. — 28. Wróblewski F., La Due J. S.: Ann. Int. Med.; 1955, 43, 345. — 29. Wróblewski F., Cabaud P.: Am. J. Clin. Pathol.; 1957, 27, 235.

ОКСИДАЗЫ И ОКСИДО-РЕДУКЦИОННЫЕ СИСТЕМЫ

STANISŁAW NOWAK

Окислительно-восстановительные процессы, как и другие типы биохимических реакций, являются этапами синтеза и распада большинства соединений, которые входят в состав организма, и играют важную роль в метаболизме биологически активных и токсических субстанций. Однако из термодинамики известно, что в природе самостоятельно могут протекать только те процессы, которым сопутствует дисперсия энергии. Таким образом основное значение тканевого окисления заключается в том, что энергия, освободившаяся в этом процессе, поддерживает все другие процессы обмена в организме.

Окислительным процессам, в которых катализатором является оксидаза, и при которых оторванные от субстрата атомы водорода непосредственно переносятся на кислород, не сопутствует образование высокоэнергетических соединений. Накапливание энергии, освобождающейся из соединений этого вида, является условием использования ее организмом. Организм не обладает способностью к обратному превращению тепловой энергии в химическую. Как известно, образование АТФ связано с многоэтапным переносом электронов между субстратом и их окончательным акцептором, то есть кислородом, осуществляемым системой переносчиков. Результатом указанной многоэтапности переходов электронов является постепенное освобождение энергии, что имеет большое значение для использования ее организмом.

Обмен энергии в клетках происходит главным образом в митохондриях. Основным структурным элементом митохондрий является трехслойная оболочка, окружающая их снаружи и образующая перегородки (*cristae*) внутри них. В митохондриальной оболочке находятся прочно связанные с субстратом флавопротеиды: редуктаза НАД·Н₂ цитохрома с (НАД·Н₂ цитохром с оксидоредуктазой), сукцинат-дегидрогеназа, цитохромы b, c, c₁, а цитохром-оксидаза и кофермент Q, образующие системы оксидазы НАД·Н₂ и сукцинат-оксидазы. Там вероятно находятся ферменты, катализирующие комбинированное окислительное фосфорилирование. Дегидрогеназы и другие ферменты, принимающие участие в цикле Кребса и окислении жирных кислот, относительно свободно связаны с субстратом. В пространствах между митохондриальными перегородками находятся ферменты, принимающие участие в синтезе белков, жирных кислот и фосфолипидов (8).

При исследовании тканевых окислительных процессов в основном пользуются препаратами двух типов: 1) изолированными митохондриями, в которых происходит комбинация окислительно-восстановительных процессов с окислительным фосфорилированием. Пользуясь взвесью промытых митохондрий удалось воспроизвести все этапы сжигания пирувиноградной кислоты (цикл Кребса); 2) так называемыми препаратами малых частичек (субмитохондриальных). Это фрагменты пограничной оболочки митохондрий. Если при приготовлении их не будет нарушено слоистое строение пограничной оболочки, то эти препараты также могут катализировать образование АТФ.

Большие трудности встречаются при изолировании отдельных составных частей дыхательной цепочки. Поэтому для достижения этой цели иногда приходится прибегать к применению детергентов, фракционированию центрифугированием и высаливанию, а также воздействию протеолитическими ферментами. Тесная связь между отдельными составными частями дыхательной цепи заставляет предполагать, что на их активности сказывается определенная последовательность их расположения в структурных образованиях клетки. Во время препаровки этот порядок расположения нарушается и его

невозможно воссоздать путем обычного смешивания изолированных элементов.

Сложность проблемы механизма окислительных процессов и обмена энергии в организме, разрешение которой нуждается в изучении функции крупных образований, какими являются митохондрии, привело к тому, что лишь в последние годы удалось преодолеть некоторые из указанных выше трудностей. Однако следует подчеркнуть, что остаются окончательно еще не разрешенными многие вопросы, как, например, количество составных частей дыхательной цепи и их взаимное расположение.

Параллельно с изучением механизмов тканевого окисления и накопления освобождающейся энергии, в последнее время производятся многочисленные исследования, целью которых является определение роли окислительно-восстановительных ферментов в гормональной регуляции а также в процессах адаптации к изменениям условий окружающей среды. Кроме того изучается также значение нарушений клеточного дыхания в этиопатогенезе ряда заболеваний. Эти работы затрудняет тот факт, что мы не обладаем методикой измерения концентрации ферментов, ввиду чего иногда невозможно уловить действие активаторов и ингибиторов. Неизвестно также, имеется ли параллелизм между активностью фермента внутри клетки и активностью, определенной в условиях эксперимента „in vitro“. Поэтому полученные результаты часто не только не облегчают интерпретацию исследуемых явлений, но и не могут также считаться окончательным ответом на поставленный вопрос. Дополнительной трудностью для клинического анализа окислительно-восстановительных ферментов является необходимость пользования тканевым материалом.

Интересные результаты были получены в исследованиях влияния некоторых гормонов на окислительно-восстановительные ферменты. При изучении механизма действия эстрогенов было обнаружено, что они стимулируют трансгидрогеназу, содержащуюся в слизистой оболочке матки. Это приводит к увеличению количества образующихся богатознергетических соединений (АТФ) при окислении НАДФ·Н₂. Анаболическое действие этих гормонов, проявляющееся прежде всего в быстром росте слизистой оболочки матки в пролиферативной фазе („*stadium proliferationis*“), является, в свете вышеприведенных результатов, следствием доставки большого количества энергии, необходимой для поддержания всех видов обмена и особенно белкового (27). В последнее время появились сообщения о выделении из предстательной железы трансгидрогеназы, активизируемой андрогенами (1).

Гормоны коры надпочечников также влияют на окислительные процессы в тканях. Установлено, что они вызывают уменьшение потребления глюкозы экстрактами нормальной и опухолевой лимфатической ткани. Кортикостероиды при этом тормозят не только гликолиз, но и сгорание солей пировиноградной кислоты до СО₂ и Н₂О. Торможение гликолиза, вероятно, является результатом влияния на некоторые реакции, зависящие от АТФ. Стероиды надпочечников увеличивают активность АТФ (29). Kerppola (11) в опытах на крысах установил, что падение потребления О₂ после введения кортизона является результатом тормозящего влияния его на цитохром-оксидазу. Активность сукцинат-дегидрогеназы и редуктазы НАДФ·Н₂ цитохрома с падает при этом лишь незначительно. Падение окислительного фосфорилирования является более значительным, чем это вытекало бы только из торможения цитохром-оксидазы.

Тироксин вызывает диссоциацию окислительных процессов и окислительного фосфорилирования. Исследования изолированных ферментов показали, что под влиянием тироксина увеличивается активность редуктазы НАДФ·Н₂ цитохрома с. Обнаружено также увеличение активности некоторых дегидро-

геназ, взаимодействующих с НАДФ (дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата и 6-фосфо-глюконовой кислоты), а также уменьшение активности трансгидрогеназы. На основании этих наблюдений можно объяснить действие тироксина торможением окисления НАДФ·Н₂ путем перенесения водорода на НАД. Увеличение окисления НАДФ·Н₂ путем прямой редукции цитохрома с ведет к падению коэффициента Р₁О (27). Следует отметить, что эта теория не является единственной в объяснении действия тироксина. Установлено, что уже в физиологических концентрациях этот гормон, после прибавления его к изолированным митохондриям, приводит к их набуханию, причем, наряду с ростом окислительных процессов, наблюдается уменьшение образования АТФ. При наличии ионов калия влияние тироксина может принять обратное направление после прибавления АТФ. Сморщиванию митохондрий сопутствует увеличение окислительного фосфорилирования. Можно предположить, что ввиду близкого расположения окислительно-восстановительных ферментов, сопрягающих фосфорилирование в нормальных условиях, само изменение внутренней структуры митохондрий, вызванное набуханием, может привести к обратимой диссоциации этих процессов.

Другой областью, привлекающей внимание исследователей, является состояние гипоксии и гипотермии. У животных, родившихся в условиях кислородного голодания, в некоторых тканях отмечается рост активности цитохром-оксидазы (в почках) и увеличение количества цитохрома с (в печени, сердце и мышцах, 24, 25). Исследованием активности цитохромных редуктаз установлено увеличение активности фермента, взаимодействующего с НАД при одновременном незначительном уменьшении редуктазы НАДФ·Н₂ цитохрома с. Следует судить, что ферментативная адаптация при гипоксии вероятно заключается в лучшем использовании освобождающейся энергии путем увеличения количества высокоэнергетических соединений (9, 21). Об этом свидетельствуют также опубликованные в последнее время (20) исследования активности комплексов окислительных ферментов НАДФ·Н₂ и НАД·Н₂ (оксидазы НАДФ·Н₂ и НАД·Н₂) и трансгидрогеназы. В условиях гипоксии обнаружено увеличение оксидазы и трансгидрогеназы в мышцах и сердце, и незначительное увеличение активности оксидазы в печени. Оксидазы в этих тканях не подвергаются изменениям. На разрезах мышц у животных, подвергнутых гипоксии, гистохимически обнаружено увеличение поверхности так называемых красных полей, богатых миоглобином и ферментами, а также увеличение активности сукцинат-дегидрогеназы в белых полях (26). У животных, помещенных в условия низкой температуры наряду с увеличением потребления кислорода, отмечается ослабление окислительного фосфорилирования. Механизм этих изменений еще окончательно не выяснен. Нам кажется, что они не являются лишь результатом действия тироксина (10, 23).

На окислительные процессы и связанное с ними фосфорилирование оказывает влияние также процесс старения. Установлено, что в митохондриях с возрастом падает продуктивность образования АТФ при окислении солей α-кетоглутароновой, β-гидроксимасляной и янтарной кислот (28). Особый интерес представляет зависимость метаболических процессов в стенках кровеносных сосудов от возраста. Исследованиями, произведенными до настоящего времени, не обнаружено непосредственного расстройства потребления кислорода стенками сосудов. Некоторые авторы обнаружили падение потребления кислорода у более старых животных (2, 14). Mandel (17) считает, что связанное с возрастом падение образования высокоэнергетических соединений приводит прежде всего к расстройству белкового обмена и синтеза мукополисахаридов. С этим связана большая склонность к отложению липидов в стареющей стенке сосудов. Производились сравнительные исследова-

ния актив
потных раз
выводов с
артериоск
гипертонии
увеличение
судистой
между по
ется причи
при гипер
При кра
тохром-окс
в начальн
нуклеинов
животного
кислоты, п
30 лет н
сущность
тельно-вос
нать, что у
наков мет
стоящего
ферментов
как нам ка
чение особ
остается а
щаются,
процессам
опухолево
Интерес
гликолиза
(3). Митох
дают спос
ренесении
участие к
(3, 13). И
редукции
фоглицери
акцептор
дриях эти
ваниям ав
дегидроге
что прив
дающейся
этом моло
не подвер
ходящего
соединени
лиза.
Интерес
которых
окислите
низма де

ния активности цитохром-оксидазы и сукцинат-дегидрогеназы в аорте у животных разного вида. Однако на основании этих исследований нельзя сделать выводов о взаимозависимости склонности сосудов к экспериментальному артериосклерозу и окислительных процессов в сосудистой стенке (16). При гипертонии у крыс, вызванной ДОСА и диетой, богатой солью, замечено увеличение потребления кислорода и активности цитохром-оксидазы в сосудистой стенке. Авторы высказывают предположение, что несоответствие между потребностью в кислороде и количеством доставляемой крови является причиной более быстрого развития дегенеративных изменений в сосудах при гипертонии (5).

При кратковременной голодовке установлено увеличение цитохрома с и цитохром-оксидазы в печени (22). В процессе регенерации печеночной ткани в начальном периоде ускоряется как образование цитохрома с, так и рибонуклеиновой кислоты, независимо от содержания белка в диете подопытного животного. После восстановления уровня цитохрома с и рибонуклеиновой кислоты, пища, богатая белком, значительно ускоряет регенерацию печени (6).

30 лет назад большой интерес вызвала теория Варбурга, согласно которой сущность новообразовательных процессов заключается в вытеснении окислительно-восстановительных процессов анаэробными. И сегодня следует признать, что увеличение гликолиза является одним из наиболее характерных признаков метаболизма опухолевой ткани. Исследования, проведенные до настоящего времени, не подтвердили, что снижение активности дыхательных ферментов является постоянным признаком опухоли. Увеличение гликолиза, как нам кажется, является общим свойством быстро растущих тканей. Изучение особенностей окислительно-восстановительных процессов в опухолях остается актуальной проблемой, к которой различные ученые часто возвращаются, хотя в расстройстве равновесия между аэробными и анаэробными процессами мы уже не видим причины, а видим лишь одно из проявлений опухолевой гиперплазии.

Интересную мысль, объясняющую механизм увеличения анаэробного гликолиза в опухолевых клетках, высказали в последнее время Boxer и Devlin (3). Митохондрии, как оказалось в свете последних исследований, не обладают способностью окисления НАД·Н₂, находящегося в цитоплазме. В перенесении водорода из цитоплазмы внутрь митохондрий вероятно принимают участие кетосоединения: фосфодигидроксиацетон и ацетоуксусная кислота (3, 13). Под влиянием соответствующих дегидрогеназ они подвергаются редукции до гидроксипроизводных (D β-гидроксимасляная кислота и α-фосфоглицерин), причем регенерирует НАД (окисленный), необходимый как акцептор водорода при окислении 3-фосфоглицерин альдегида. В митохондриях эти соединения снова подвергаются окислению. Согласно исследованиям авторов, о которых речь была выше, в опухолевых клетках отсутствуют дегидрогеназы, катализирующие редукцию вышеуказанных кетонных тел, что приводит к усиленному проникновению водорода из НАД·Н₂, находящегося в цитоплазме, в пировиноградную кислоту. Образующаяся при этом молочная кислота не может далее окисляться митохондриями, пока снова не подвергнется окислению до пировиноградной кислоты за счет НАД, находящегося в цитоплазме. Торможение образования высокоэнергетических соединений в цикле Кребса приводит к последующему увеличению гликолиза.

Интересные результаты были получены при исследованиях влияния некоторых токсических субстанций и лекарственных веществ на тканевые окислительные процессы. Эти данные используются для объяснения механизма действия многих веществ на организм. Действие цитохром-оксидазы

тормозят цианиды, азиды и H_2S . Активность этого фермента тормозит также хлорпромазин. Амита́л тормозит окисление флавопротенда, содержащегося в оксидазе НАД· H_2 . Антимидин, как и некоторые другие субстанции, блокирует редукцию цитохрома c_1 . Динитрофенол и дикумароль нарушают оксидативную фосфорилиацию. Влияние субстанций, наиболее часто применяемых в исследованиях процессов тканевого окисления, представлено на рисунке 31. Установлено также, что некоторые вещества тормозят активность моноаминоксидазы. Возможность такого влияния на обмен биогенных аминов в организме используется в терапевтических целях (подробней смотри: ингибиторы моноаминоксидазы в главе о ферментотерапии).

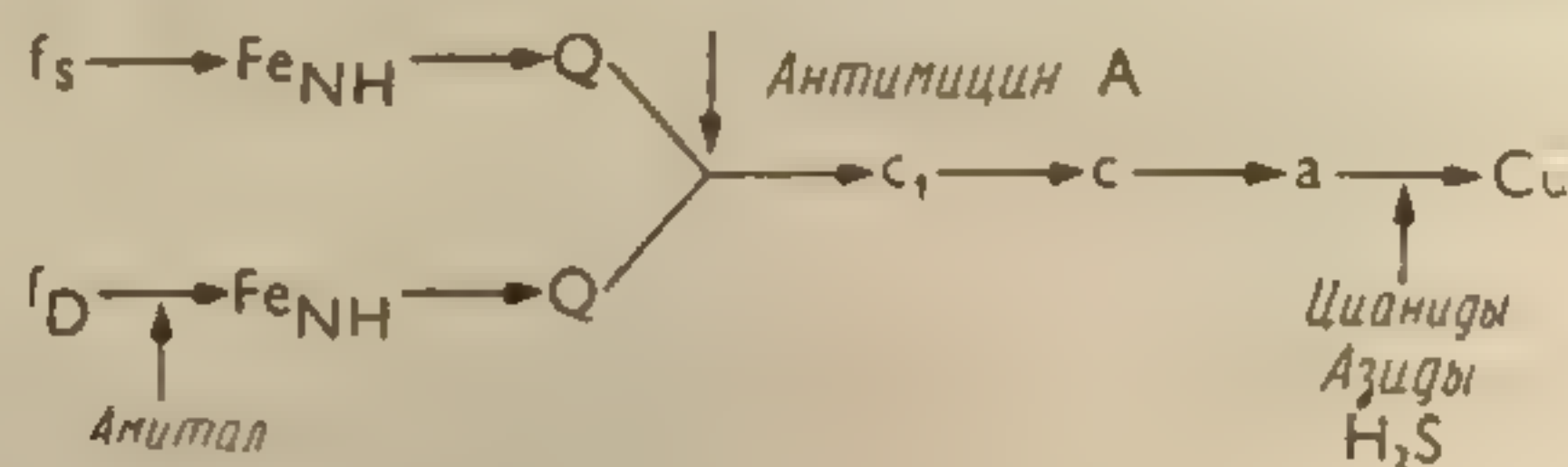


Рис. 31. Место действия некоторых ингибиторов на цепь переносчиков электронов. Согласно Green (8), модифицировано. f_s , f_D — флавопротеиды; Q — кофермент Q ; a , c , c_1 — цитохромы; Fe — железо, не входящее в состав гема; Cu — медь цитохромоксидазы.

Клинический интерес к ферментологии возрос с тех пор, когда определение активности ферментов приобрело значение в диагностике некоторых заболеваний, а ферментотерапия нашла более широкое применение. Была показана возможность использования в диагностических целях также многих окислительно-восстановительных ферментов. Десмоферменты прочно связаны с субстратом и в сыворотке обычно не встречаются, за исключением некоторых дегидрогеназ. Они приведены в таблице 9. Там же перечислены заболевания, при которых отмечается увеличение их активности в сыворотке. Следует подчеркнуть, что рост активности перечисленных ферментов является лишь доказательством поражения или разрушения клеток, главным образом в паренхиматозных органах. Расстройств в течении окислительно-восстановительных процессов в организме невозможно обнаружить путем исследования ферментов в сыворотке. Определенный интерес в клинике представляет каталаза. Этот фермент в настоящее время не имеет диагностического значения. Отсутствие его в крови (акаталазия) установлено при различных воспалительных процессах слизистой оболочки ротовой полости. Активность каталазы в тканях, например в печени, снижается при развитии злокачественных опухолей. Издавна применяется также гистохимическая реакция на пероксидазу, при помощи которой можно легче различить разные виды лейкоцитов. Имеются сообщения о том, что увеличение активности хининоксидазы является специфическим для заболеваний печеночной паренхимы. В свете новых наблюдений этот тест, однако, не является ферментативной пробой. Уменьшение содержания редуцированного глутатиона и падение активности глюкозо-6-фосфата обнаружено в эритроцитах при некоторых приобретенных гемолитических анемиях (фавизм, повышенная чувствительность к примакину), а также при гемолитической желтухе новорожденных, не являющейся следствием серологического конфликта. Роль этих расстройств в этиопатогенезе заболеваний до настоящего времени не выяснена. Возможно, что некоторое значение имеет уменьшение количества редуцированного трифосфопиридиннуклеотида (НАДФ· H_2). Ведутся исследования над возможностью использования определения актив-

ности цитохром-оксидазы в гистохимической диагностике на секционном материале при инфаркте миокарда (4).

Свойствами окислительно-восстановительного фермента обладает церулоплазмин (содержащая медь оксидаза). Он способствует окислению бензидина и парафенилдиамина, что используется при определении этого фермента. Нормальное содержание церулоплазмينا в плазме равно 20—35 мг⁰/₀. Количество его изменяется при некоторых заболеваниях. Однако практическое значение имеет лишь уменьшение содержания церулоплазмينا в плазме при болезни Вильсона (гепатолентикулярной дегенерации). Плазма новорожденных содержит мало церулоплазмينا (около 7 мг⁰/₀). Хроматографически в плазме удалось обнаружить две фракции церулоплазмينا. Соотношение концентрации этих фракций, однако, одинаково как у больных, так и у здоровых. Следует еще отметить, что до настоящего времени не выяснено, играет ли действительно церулоплазмин роль фермента в организме. Пока он не внесен в таблицу известных ферментов (10).

Таблица 9

Дегидрогеназы, активность которых определяется с диагностической целью

Нп.	Название фермента	Заболевания, при которых активность фермента повышается
1.	Лактатдегидрогеназа	Инфаркт миокарда, заболевания паренхимы печени, ревматизм, лейкозы, злокачественные новообразования, тиреотоксикоз, хронический нефрит, диабетическая кома, беременность, отравление СО и барбитуратами
2.	Малатдегидрогеназа	Инфаркт миокарда, поражение печени, тиреотоксикоз, печеночная кома, хронический нефрит, отравление СО и барбитуратами, ревматизм
3.	1-идитол (сорбитол) дегидрогеназа	Гепатиты
4.	Глутаматдегидрогеназа	Поражение паренхимы печени, <i>dystrophia musculorum Erba</i>
5.	Изоцитратдегидрогеназа	Поражение паренхимы печени, скелетных мышц
6.	α -гидроксibuтират дегидрогеназа	Инфаркт миокарда, поражение паренхимы печени

Кофермент Q обнаружен в моче, однако до настоящего времени нет сообщений о расстройствах выделения его при патологических состояниях (12).

Интерес представляют попытки применения цитохрома с с терапевтической целью, особенно при отравлениях окисью углерода. Однако этот метод пока не нашел широкого клинического применения.

Методы определения дегидрогеназ, имеющих диагностическое значение, приведены в другом месте.

Ниже приводим методику определения церулоплазмينا (Ravin) (18). Принцип методики основан на реакции ферментативного окисления парафенилдиамина (ПФД).

Реактивы:

1) реактив ПФД: двусолянокислый парафенилдиамин растворяют в минимальном объеме горячей дистиллированной воды, затем раствор обесцвечивают активированным углем и фильтруют в горячем состоянии. Фильтрат ставят для рекристаллизации в холодильник при температуре 4°C. Выпавшие белые кристаллы очищенного ПФД сушат и хранят в вакууме над хлористым кальцием. Очищенные кристаллы можно с успехом хранить в запаянных стеклянных трубочках;

Из очищенного препарата непосредственно перед употреблением приготавливают 0,5% раствор.

2) 0,4 М ацетатный буфер с рН 5,5. Приготавливают его в большом количестве и хранят при температуре 4°C;

3) 0,5% водный раствор азиды натрия (неограниченно стойкий при комнатной температуре).

Ход исследования: определение активности церулоплазмينا следует производить в сыворотке без следов гемолиза. Для анализа непригодна также сыворотка, экстинкция которой, после разведения ее 0,4 М ацетатным буфером в отношении 1:100, превышает 0,1. Для анализа можно пользоваться также сывороткой, которая сохранилась даже несколько недель при температуре 0°C. В 3 силиконизованные пробирки наливают по 0,1 мл сыворотки. В одну из них прибавляют 1 мл 0,5% раствора азиды натрия (контрольная проба), а затем во все три пробирки по 8 мл ацетатного буфера, после чего также во все пробирки по 1 мл 0,5% раствора ПФД. После смешивания опытные пробы погружают в водяную баню на 1 час при температуре 37°C таким образом, чтобы жидкость в пробирках была на одном уровне с водой в водяной бане. По окончании инкубации к опытным пробам прибавляют по 1 мл 0,5% раствора азиды натрия. После смешивания содержимого, пробирки ставят в холодильник на 30 минут при температуре 4—10°. Раствор колориметрируют в кюветах толщиной 1 см при длине волны 530 мμ. В нормальных условиях экстинкция колеблется в пределах от 0,2 до 0,7. Если экстинкция превышает 0,7, то следует повторить определение с разведенной сывороткой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baron D. N., Gore M. B. R., Williams D. C.: Biochem. J. 1960, 74, 200. — 2. Barrows Ch. H., Chow B. F.: A. I. Lansing: (editor) The arterial wall. Baltimore 1959, 192. — 3. Boxer G. E., Devlin T. M.: Science 1961, 134, 1495. — 4. Burstone M. S., Miller F. N.: Amer. J. Clin. Path. 1961, 35, 118. — 5. Daly M. M., Gurpide G.: J. Exper. Med. 1959, 109, 187. — 6. Drabkin D. L.: J. Biol. Chem. 1947, 171, 395. — 7. Elliot B. A., Wilkinson J. H.: Lancet 1961, 1, 698. — 8. Green D. E.: Structure and function of subcellular particles. Reprint of a paper to be read at the Vth International Congress of Biochemistry. Moscow 10—16 VIII, 1961. Plenary Lecture Reprint No 176. — 9. Green J. A.: Fed. Proc. 1961, 20, 210. — 10. Hannon J. P.: Fed. Proc. 1961, 19, suppl. 5, 139. — 11. Kerppola W., Ritkannen E.: Endocrinology 1960, 67, 162. — 12. Koniuszy F. R., Gale P. H., Page A. C., Folkers K.: Arch. Biochem. Biophys. 1960, 87, 2. — 13. Krebs H. A.: Biochem. J. 1961, 80, 225. — 14. Lehninger A. L.: A. I. Lansing (editor): The arterial wall. Baltimore 1959, 220. — 15. Lehninger A.: Pediatrics 1960, 26, 466. — 16. Maier N., Haimovici H.: Amer. J. Physiol. 1958, 195, 476. — 17. Mandel P.: Metabolisme de la paroi vasculaire. Thèses du IV^e Congrès International d'Angiologie. Praha 1961, 130. — 18. Ravin H. A.: J. Lab. Clin. Med. 1961, 58, 161. — 19. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry 1 Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1961. — 20. Reynafarje B.: Amer. J. Physiol. 1961, 200, 351. — 21. Reynafarje B., Green J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1960, 103, 224. — 22. Schmidt C. G.: Klin. Wchsr. 1956, 34, 457. — 23. Smith R. E.: Fed. Proc. 1960, 19, Suppl. 5, 152. — 24. Tappan D. V., Reynafarje B. D., Potter K., Hurtado A.: Amer. J. Physiol. 1957, 190, 93. — 25. Tappan D. V., Reynafarje B. D.: Amer. J. Physiol. 1957, 190, 99. — 26. Valdivia E.: Fed. Proc. 1961, 20, 209. — 27. Villee C. A.: D. M. Greenberg and H. A. Harper (editors): Enzymes in health and disease. Springfield Illinois 1960, 73. — 28. Weinbach E. C., Garbus J.: J. Biol. Chem. 1959, 234, 412. — 29. White A.: Pediatrics 1960, 26, 476.

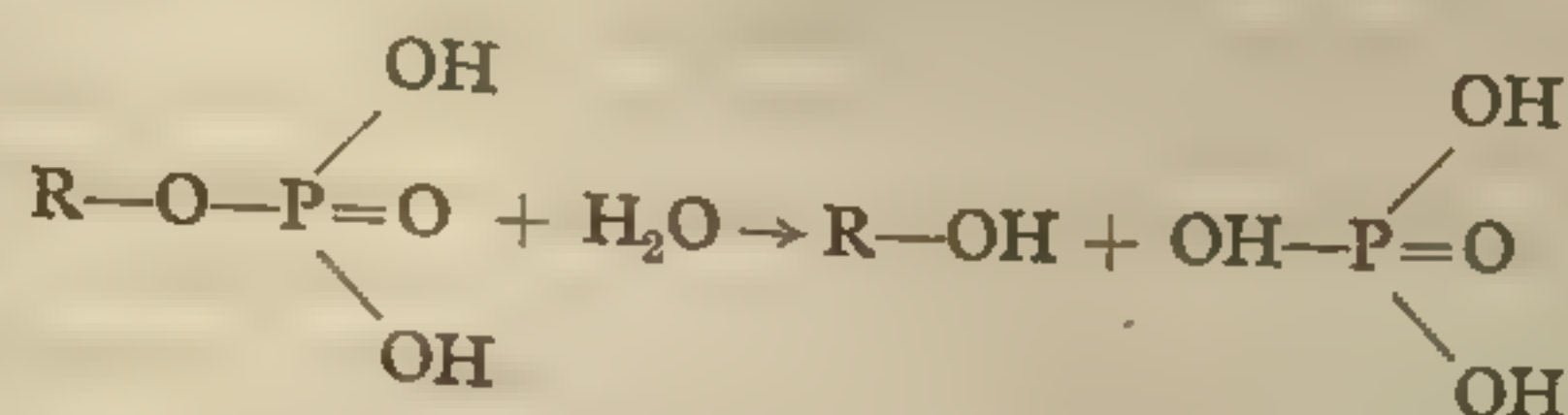
ФОСФАТАЗЫ

MARIAN ORŁOWSKI

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

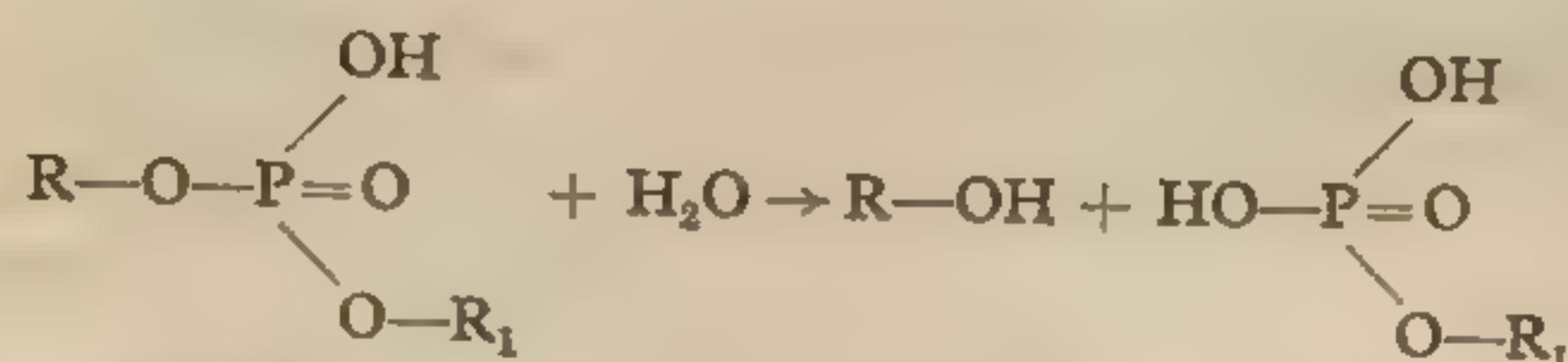
Фосфатазы являются ферментами, которые отщепляют остаток фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. Первые сообщения о существовании таких ферментов в рисовых отрубях встречаются в работах японских ученых (66). Вскоре после этого наличие их было установлено и в тканях животных. Фосфатазы можно разделить на фосфомоноэстеразы и фосфодиэстеразы. В данной главе будут рассмотрены лишь первые.

Фосфомоноэстеразы гидролизуют простые эфиры фосфорной кислоты по следующей схеме:



Ферменты этого типа очень распространены как в животном, так и в растительном мире. Они обнаружены в почках, слизистой оболочке кишечника, костях, предстательной железе, печени, поджелудочной железе, легких, селезенке, щитовидной железе, яичках, мышцах, мозге, крови, моче, эритроцитах, лейкоцитах и других тканях.

Фосфодиэстеразы гидролизуют двойные эфиры фосфорной кислоты по схеме:



Специфичность фосфатаз очень разнообразна. Местом приложения некоторых из этих ферментов является только определенный вид эфирной связи; они не проявляют специфичности по отношению к органической части гидролизуемого фосфатного эфира. Так например, существуют фосфомоноэстеразы, гидролизующие целый ряд разных фосфатных эфиров, независимо от строения органического остатка. Существуют также фосфодиэстеразы, обладающие только групповой специфичностью. Кроме того имеются фосфатазы с довольно узкой специфичностью по отношению к определенным фосфатным эфирам, например, глюкозо-6-фосфатаза, 5-нуклеотидаза, фруктозо-1,6-дифосфатаза, которые практически гидролизуют только соответствующие их названию фосфатные эфиры.

Для фосфомоноэстераз с групповой специфичностью (изодинамические фосфатазы), а не с субстратной, в настоящее время еще применяется деление на четыре типа, которые ввели Folley и Kay (20). Эта классификация с некоторыми дополнениями (57) приведена в таблице:

Тип	Оптимум pH	Оптимальная стабильность фермента pH	Активаторы	Ингибиторы	Скорость разложения α и β глицерофосфата	Встречаются
I	8,6—9,4	7,5—8,5	Mg^{++} , Zn^{++} Co^{++} , Mn^{++}	—SH цианиды	$\beta > \alpha$	слизистая оболочка, кишечник, почки, кости
II	5,0—5,5	5,0—6,0		F^-	$\beta > \alpha$	предстательная железа
III	3,4—4,2	4,5—5,5		Mg^{++}	$\beta > \alpha$	печень
IV	5,0—6,0	6,5—7,5	Mg^{++}		$\alpha > \beta$	эритроциты

Исследования индивидуальной специфичности фосфатаз затруднены, так как до настоящего времени не удалось получить в кристаллическом состоянии ни одного из этих ферментов.

Установлено, что кроме гидролитической функции, фосфатазы обладают способностью переносить фосфатные остатки, то есть функцией трансферазы

(48). Донаторами в этих реакциях может быть ряд эфиров, встречающихся в физиологических условиях и полученных синтетически, например, фосфокреатин, фосфенолопиригронат, глюкозо-1-фосфат, п-нитрофенилфосфат и другие. Акцепторами остатков фосфорной кислоты могут быть простые спирты, глицерин, фруктоза, глюкоза и другие. В настоящее время неизвестно, какое физиологическое значение имеют реакции этого типа и в какой степени они происходят в живых организмах. Реакции, катализируемые фосфатазами, являются равновесными, причем равновесие так далеко перемещено в направлении гидролиза, что является мало вероятным, чтобы синтез фосфатных эфиров под влиянием этих ферментов имел физиологическое значение.

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА

Этим термином определяется ряд ферментов, общей чертой которых является оптимум рН примерно 9,0, более быстрое разложение β -глицерофосфата, чем α изомера, а также активирующее влияние ионов магния. Ферменты с этими свойствами относятся по приведенной выше классификации к типу I фосфомоноэстераз. Инактивирует их ряд соединений, обладающих способностью образовывать комплексы с ионами металлов, такие как цианаты, цистеин, глутатион, фенантролин, α, α' -дипиридил и другие. Тормозящее влияние оказывают также соединения, реагирующие с аминными группами, как нитриты, формальдегид и хиноны. Инактивацию, вызванную соединениями, образующими комплексы, в некоторой степени удается обратить путем диализа или прибавления ионов двухвалентных металлов. Действие соединений, реагирующих с аминными группами, необратимо.

Фосфатаза широко распространена в животных тканях. Наилучшими источниками фермента являются: слизистая оболочка кишечника, почки, костная ткань и печень. Щелочную фосфатазу костей впервые описал Robinson (56). Она встречается в костях там, где происходят процессы окостенения, в которых ей приписывается важное физиологическое значение. Этот фермент обнаружен в области эпифизарного хряща длинных костей, но его нет в гиалиновом хряще. По мнению некоторых авторов щелочная фосфатаза костей вызывает освобождение неорганических фосфатов из эфиров фосфатных сахаров, образующихся из гликогена в остеобластах. При наличии ионов кальция дело доходит до выпадания в основной субстанции кости нерастворимых фосфатов и кальция. Содержание щелочной фосфатазы в костях у детей в периоде роста многократно превышает содержание ее у взрослых. Также у животных с рахитом количество этого фермента в костях превышает количество его у здоровых животных. Это является проявлением патологически повышенной активности остеобластов, клеток, принимающих участие в процессе образования костной ткани. Большое количество щелочной фосфатазы имеется в слизистой оболочке кишечника. Она локализуется в микросомах клеток поверхностного эпителия и вероятно принимает участие в реабсорбции сахаров из просвета кишечника. Такое же участие в реабсорбции сахаров приписывается щелочной фосфатазе, имеющейся в клетках извитых канальцев почки (45). Первым этапом в реабсорбции сахара было бы фосфорилирование молекул глюкозы: в почечных канальцах обнаружена активная ферментная система, фосфорилирующая глюкозу (35). Освобождение и выделение затем глюкозы в кровяное русло происходило бы путем дефосфорилирования образовавшихся фосфатных эфиров при помощи фосфомоноэстераз. Наиболее частым источником препаратов очищенной щелочной фосфатазы является слизистая оболочка тонкого кишечника.

В сыворотке имеется фосфатаза с оптимум рН примерно 9,0, которая по своим свойствам сходна с ферментом, находящимся в костях.

Принято считать, что фермент сыворотки происходит главным образом из костной системы. Об этом свидетельствует ряд клинических и экспериментальных данных. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке у детей гораздо более высокая, чем у взрослых, что приписывается усиленной функции остеобластов в связи с ростом костной системы. Не отмечено уменьшения активности фосфатазы сыворотки у подопытных животных после удаления печени, почек, яичек, селезенки и кишечника. Применением специфических антител против фосфатазы из кишечника и костного мозга установлено, что у людей с повышенной активностью ферментов в сыворотке мало вероятным является их кишечное происхождение (59). О костном происхождении фермента сыворотки свидетельствует увеличение активности его при ряде заболеваний костной системы (36, 37). Увеличение активности фермента в сыворотке имеет место при рахите (14), причем колебания активности его довольно верно отображают динамику патологического процесса; активность уменьшается после применения препаратов витамина D (64).

Постоянное увеличение активности щелочной фосфатазы сыворотки имеет место также при остеомалиции, болезни Педжета, Реклингаузена (*osteodystrophia fibrosa generalisata cystica*) (26, 27), при остеосаркомах (*sarcoma osteogenes*) (21), а также при метастазах опухолей в кости. Увеличение активности фермента описано также при синдроме Фанкони (47), при *osteogenesis imperfecta* (65). Нормальная активность щелочной фосфатазы встречается при остеопорозах, деформирующем спондилозе, болезни Бехтерева, деформирующем артрозе и при болезни Albers-Schönberg. Резкое увеличение активности щелочной фосфатазы наблюдается у больных с механической желтухой, а также при билиарном циррозе печени (55, 28). Увеличение активности фермента наступает не только при закупорке общего желчного протока, но и при затруднении оттока желчи в результате закупорки внутрипеченочных желчных путей и при воспалении желчных протоков (*cholangitis*) (41). В меньшей степени активность щелочной фосфатазы увеличивается при паренхиматозном гепатите и при циррозе печени. Диагностическое значение имеет также исследование активности щелочной фосфатазы сыворотки для обнаружения метастазов опухолей в печень (19, 62). Ученые задумывались над механизмом увеличения активности щелочной фосфатазы при заболеваниях печени. Наиболее широко распространена следующая теория: костная система является источником фермента в сыворотке, причем печень удаляет фермент из сыворотки, выделяя его в желчь. При затруднении оттока желчи наступает накопление фермента в сыворотке и увеличение его активности. Ряд авторов считают, что в увеличении активности щелочной фосфатазы при заболеваниях печени большую роль играет активное усиление продукции фермента печеночными клетками. Некоторые авторы стараются объяснить рост активности щелочной фосфатазы при механических желтухах активизацией уже существующего фермента сыворотки составными частями желчи, печеночными клетками, или продуктами бактериального происхождения при существующем холангите (46).

Как уже было указано выше, активность щелочной фосфатазы сыворотки является более высокой у детей и постепенно падает к 18—20 годам жизни. У недоношенных детей активность эта еще более высокая, чем у детей, родившихся в срок. У мужчин активность этого фермента на 20—30% более высокая, чем у женщин. Во время беременности активность фермента увеличивается, особенно между 6 и 9 месяцами. Описаны колебания активности фермента у детей в зависимости от времени года, причем в летние месяцы

она на 50% ниже, чем в зимние. Это связывают с гиповитаминозом у детей в зимние месяцы (4). Исследовано также влияние гормонов на активность щелочной фосфатазы. Кастрация и удаление гипофиза приводят к уменьшению активности фермента. Соматотропин увеличивает активность, тогда, как АКТГ снижает активность фермента. У животных тироксин увеличивает активность, а диодтирозин снижает (4). Различные факторы „стресса“ увеличивают активность фосфатазы лейкоцитов у людей, причем тот же эффект можно получить введением АКТГ (68). При электрофоретическом разделении белков на крахмальном столбике установлено, что щелочная фосфатаза обладает подвижностью, соответствующей α_1 и α_2 -глобулинам, с преобладанием активности в области α_2 -глобулинов. При заболеваниях костей среднее содержание фосфатазы α_1 равнялось 2,2%, тогда как соответствующее содержание при инфильтрационных заболеваниях печени и при механических желтухах равнялось 16,2%. В сыворотке у здоровых людей и больных с поражением печеночных клеток соответствующее количество равнялось 1,8 и 3,5%. Обе фосфатазы имели одинаковый оптимум pH и одинаковую чувствительность к цианидам. Значительная часть фосфатазы желчи обладала подвижностью, соответствующей α_1 -глобулинам (58).

КИСЛАЯ ФОСФАТАЗА (Φ_k)

Имеется несколько фосфатаз с кислым оптимум pH. Наибольшее клиническое значение имеет кислая фосфатаза предстательной железы, относящаяся ко II виду фосфомоноэстераз. Кроме предстательной железы ферменты с такими же свойствами имеются также в печени, селезенке, и в меньшем количестве в других органах. Предстательная железа у человека является органом наиболее богатым Φ_k , чем и объясняется высокое содержание ферментов в соке предстательной железы, сперме и моче у мужчин (15, 43). Только предстательная железа человека и высших обезьян содержит большое количество Φ_k ; предстательная железа собаки, быка, крысы и других животных содержит лишь незначительное количество этого фермента. Кислая фосфатаза предстательной железы необратимо инактивируется спиртом, ацетоном, уретаном, чем она и отличается от других фосфатаз, имеющих в крови. 0,5% формальдегид не оказывает влияния на ее активность. Другими ингибиторами фермента являются тартраты, оксалаты и фториды. Кислую фосфатазу удалось очистить до однородного белка (49). Φ_k , как установлено путем гистохимической методики (G. Gomori), находится в железистом эпителии предстательной железы человека (23). В детском возрасте эта железа содержит небольшое количество фермента (29). Давая молодым обезьянам *rhesus* тестостерон, можно вызвать их преждевременное половое созревание, одновременно созревает железистый эпителий предстательной железы и количество Φ_k быстро увеличивается до величин, встречаемых у взрослых (30). У женщин и мальчиков с мочой выделяется небольшое количество Φ_k . В периоде полового созревания выделение фермента с мочой резко увеличивается; у мальчиков и у взрослых мужчин оно превосходит в 5 раз количество фермента в моче у женщин. Моча, собранная у мужчин при нормальном мочеиспускании, содержит больше Φ_k , чем моча, полученная катетеризацией мочевого пузыря (42, 9, 60). Эти данные свидетельствуют о том, что усиленное выделение кислой фосфатазы у мужчин в периоде полового созревания зависит от функции предстательной железы.

Неизвестно происхождение внепростатической части этого фермента в моче. Против предположения, что этот фермент происходит из эритроцитов, свидетельствует наблюдение, что Φ_k в моче у женщин парализуется M/10 тартра-

том, а не 0,5% формалином, то есть также, как Φ_k предстательной железы мужчин (14). Кислая фосфатаза сыворотки в физиологических условиях происходит вероятно из печени, селезенки и других органов, а не из предстательной железы. Об этом свидетельствует то, что активность фермента в сыворотке у женщин и у мужчин одинакова (70).

Печень, почки и селезенка содержат фосфомоноэстеразу III типа, оптимум pH которой равен 3,4—4,2. Этот фермент парализуется ионами магния; формальдегид и тартрат не оказывают на него влияния. В эритроцитах содержится кислая фосфатаза, активность которой примерно в 100 раз превышает активность фосфатазы сыворотки. Оптимум ее pH равен 5,0—6,0. Для дифференциации Φ_k эритроцитарного происхождения или Φ_k из других органов от Φ_k предстательной железы, предлагается пользоваться 0,5% формальдегидом, который не оказывает влияния на фермент предстательной железы, а ингибирует эритроцитарный и другие ферменты (1). Спирт ингибирует фермент предстательной железы; другие кислые фосфатазы печени и почек частично парализуются фторидами и оксалатами. 0,01 М фторид патрия парализует 82,6% фосфатазы предстательной железы. Очень сильным ингибитором Φ_k предстательной железы является L-тартрат, что использовано для определения активности Φ_k предстательной железы в присутствии других кислых фосфатаз. Кислая фосфатаза эндометрия реагирует так же, как Φ_k предстательной железы, то есть почти полностью парализуется 0,02 М L-тартратом (63). Ионы Си резко парализуют эритроцитарный фермент. Увеличение активности кислой фосфатазы в сыворотке почти специфически указывает на существование рака предстательной железы с метастазом в кости (31). Причиной этого увеличения активности фермента вероятно является прорастание лимфатических и кровеносных сосудов в опухолевую ткань и проникновение фермента в кровяное русло. Хирургические операции, как и ручной массаж предстательной железы, вызывают увеличение активности кислой фосфатазы в сыворотке (33). До настоящего времени почти ничего не известно о физиологической роли кислой фосфатазы у человека. Гормональный контроль фермента и высокие концентрации его в эякуляте указывают на связь фермента с процессами оплодотворения. У больных раком предстательной железы кастрация или введение больших доз эстрогенов приводит к уменьшению активности Φ_k в сыворотке.

5-НУКЛЕОТИДАЗА

Reis обнаружил в разных тканях наличие щелочной фосфатазы, специфически гидролизующей 5'-нуклеотиды, такие как аденозино- и инозино-5-фосфорная кислоты. Оптимум pH этого фермента равен 7,8 и за исключением кишечника активность его в физиологических границах pH во всех тканях у человека более высокая, чем щелочной фосфатазы (51, 52, 53, 54). Neppel и Hilmoe (32) в 50 раз очистили фермент из семенной жидкости быка и установили, что кроме двух вышеназванных нуклеотидов, он разлагает уридил и цитидил-5-фосфат, никотинамидмононуклеотид (НМН) и в меньшей степени, рибозо-5-фосфат. На 2'- и 3'-нуклеотиды фермент не действует. Больше всего фермента содержится в предстательной железе и задней доле гипофиза. Фермент в довольно большом количестве встречается также в тканях, в которых неспецифическая щелочная фосфатаза встречается лишь в незначительном количестве. К таким тканям относятся яички, стенки сосудов, щитовидная железа. Также обызвестляющийся хрящ в условиях физиологической pH железа. Также обызвестляющийся хрящ в условиях физиологической pH высоко активен по отношению к аденозин-5-фосфату. Активность фермента в сыворотке здоровых людей очень незначительна. При заболеваниях пе-

чени, сопровождающихся увеличением активности неспецифической щелочной фосфатазы, отмечается также увеличение активности 5-нуклеотидазы. У больных с заболеваниями костной системы и увеличением активности щелочной фосфатазы, активность 5-нуклеотидазы остается в норме или увеличивается лишь незначительно (16).

ФРУКТОЗО-1,6-ДИФОСФАТАЗА — ГЕКСОЗОДИФОСФАТАЗА

Gomori установил, что в печени и почках существует специфическая фосфатаза, отщепляющая фосфатный остаток в положении 1 от фруктозо-1,6-дифосфорного эфира, и гораздо слабее, от фруктозо-1-фосфорного эфира (24). Оптимум pH фермента равен 9,7, а ионы Mg и Mn активизируют его. Фенилфосфат и β -глицерофосфат ферментом не гидролизуются. Фермент вероятно имеет значение в гликогенезе из аминокислот, фруктозы и молочной кислоты. Активность его увеличивается у животных, которые получают бедную углеводами диету, а также после введения кортизона.

ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТАЗА

Глюкозо-6-фосфатаза является специфическим ферментом, разлагающим глюкозо-6-фосфат на глюкозу и неорганический остаток фосфорной кислоты. Этот фермент обнаружен в печени, почках и тонком кишечнике, где он связан с микросомной фракцией клеток. Он отличается высокой лабильностью, оптимум pH его равен 6,5. Уже через несколько часов хранения гомогенатов при комнатной температуре активность фермента резко падает (17, 8, 67, 13). Этому ферменту приписывают решающую роль в регуляции уровня сахара в крови, так как при расщеплении глюкозо-6-фосфата образуется свободная глюкоза, которая может проникать в кровяное русло. Голодание животных и диета, бедная глюкозой, а также веществами, могущими быть непосредственным источником глюкозы, вызывает увеличение активности фермента в печени. Значительное увеличение активности фермента наблюдалось также у животных с экспериментальным аллоксановым сахарным диабетом. Введение этим животным инсулина вызывало снижение активности фермента в печени. Увеличение активности глюкозо-6-фосфатазы, хотя и в небольшой степени, наступает после введения кортизона (44, 3, 22). Cori и сотрудники установили, что одна из форм болезни Gierke возникает на почве генетического дефекта, заключающегося в отсутствии глюкозо-6-фосфатазы в печени. Этим объясняется низкий уровень сахара в крови у детей с этим заболеванием, как и накопление гликогена в печени (10, 11).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФОСФАТАЗ

Активность фосфатаз чаще всего определяют при помощи синтетически полученных субстратов. С этой целью обычно пользуются α и β -глицерофосфатом, фенилфосфатом, фосфорным эфиром фенолфталеина, п-нитрофенилфосфатом, β и α -нафтилфосфатом, чаще всего в виде солей натрия. Активность фермента определяют по количеству освободившегося неорганического фосфата или по количеству освободившегося органического остатка фосфорного эфира после инкубации фермента с субстратом в течение определенного периода времени. Для определения неорганических фосфатов еще и сейчас пользуются методикой Fiske и Subarow (18), или модификацией этой методики. При определении органического остатка эфира методика зависит от химического строения соединения. При использовании в качестве субстрата

фенилфосфата натрия, количество освободившегося фенола определяют при помощи реактива Folin и Ciocalteu. Bessey и сотрудники (5) в качестве субстрата ввели п-нитрофенилфосфат. Нитрофенол, освободившийся во время реакции, можно определить, не удаляя белка из пробы, чувствительным спектрофотометрическим способом. Huggins и Talalay в качестве субстрата ввели дифосфорный эфир фенолфталеина. Показателем активности определяется непосредственно после подщелачивания пробы (34). Seligman и сотрудники для определения активности фосфатаз ввели фосфорные эфиры α и β -нафтола (61). Освободившийся во время реакции нафтол определяют колориметрически после соединения его с диазонатом в диазопигмент.

Активность фосфатаз обозначают в единицах. В этом вопросе царит большая неразбериха, так как практически имеется столько разных единиц фосфатазы, сколько описано способов ее определения. Сравнение единиц, введенных разными авторами, представляет значительные трудности и поэтому существуют трудности в сравнении результатов, полученных в разных лабораториях. Ниже перечислим наиболее часто употребляемые в клинике единицы.

Единицей Bodansky является то количество фермента, которое при pH 8,75, или 5,0 и температуре 37° вызывает в течение 1 часа освобождение 1 мг Р из 0,5% раствора β -глицерофосфата натрия на 100 мл сыворотки.

Единицей King-Armstrong является то количество фермента, которое при pH 8,9—9,1 или 5,0 и температуре $37,5^{\circ}$ вызывает освобождение в течение 30 минут 1 мг фенола из 0,005 М раствора динатрофенилфосфата на 100 мг сыворотки.

Единицей Bessey является то количество фермента, которое освобождает 1 μ моль нитрофенола/1000 мл сыворотки в течение 1 часа в условиях опыта. Хотя имеются трудности в сравнении этих единиц, однако приблизительно 1 единица Bodansky равна 2,5—3,0 единицам King-Armstronga и 0,56 единицам Bessey.

Определение активности фосфатаз сыворотки по отношению к β -глицерофосфату. Эта методика является модификацией методики Bodansky (6) и заключается в измерении количества освободившегося фосфата во время инкубации сыворотки с β -глицерофосфатом натрия.

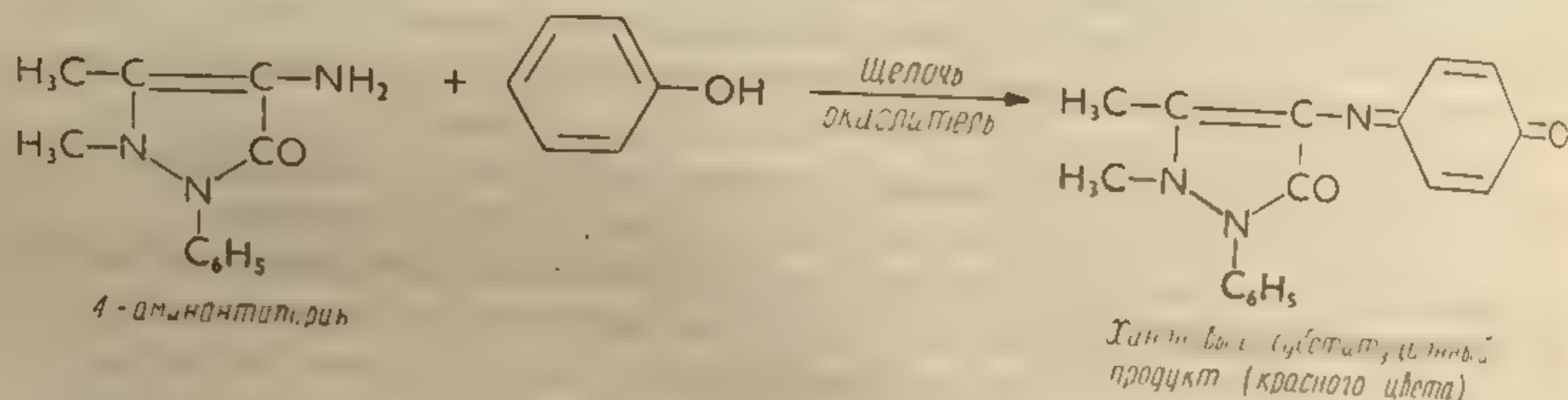
Реактивы:

- 1) Н/10 NaOH;
- 2) 1 Н уксусная кислота. 60 мл ледяной уксусной кислоты разводят водой до 1 литра и титр раствора проверяют титрованием едкой щелочью в присутствии фенолфталеина;
- 3) основной раствор β -глицерофосфата натрия: 0,85 г мединала и 1,0 г глицерофосфата растворяют в 100 мл мерной колбе и доливают водой до метки, после чего наслаивают петролейный эфир с температурой кипения $20-40^{\circ}$; хранят в холодильнике;
- 4) субстрат для щелочной фосфатазы; в мерную колбу отмеривают 50 мл основного субстрата и 2,8 Н/10 раствора NaOH. Дополняют до 100 мл. Хранят в холодильнике под слоем петролейного эфира;
- 5) субстрат для кислой фосфатазы. В 100 мл мерную колбу отмеривают 50 мл 1 Н уксусной кислоты, дополняют до 100 мл. Необходимо проверить pH, которое должно равняться 5,0. Хранят в холодильнике под слоем петролейного эфира;
- 6) 40% трихлоруксусная кислота;
- 7) реактивы для определения неорганических фосфатов по Fiske и Subarrow (18).

Ход исследования: в одну пробирку отмеривают 9 мл субстрата для щелочной фосфатазы, а в другую — 9 мл субстрата для кислой фосфатазы. Пробирки подогревают до $37,5^{\circ}$, затем прибавляют по 1 мл сыворотки. Инкубируют в течение часа, после чего прибавляют по 2 мл 40% раствора трихлоруксусной кислоты. Контрольные пробы для обоих фосфатаз ставят таким же образом с той только разницей, что сыворотку прибавляют после трихлоруксусной кислоты. После удаления осадка белка центрифугированием или фильтрацией, прирост неорганических фосфатов определяют в части полученных фильтратов инкубированных смесей для кислой или щелочной фосфатазы.

Активность фермента выражают в единицах Bodansky. За одну единицу принимают такое количество фермента, которая на 100 мл сыворотки освобождает 1 мг фосфора в течение 1 часа. От количества фосфора инкубированной пробы следует отнять количество фосфора контрольной пробы. Полученный результат, умноженный на 100, дает активность фосфатазы в единицах Bodansky. У здоровых взрослых людей активность щелочной фосфатазы не превышает 2—5 единиц Bodansky, а кислой фосфатазы — 1 единицы.

Определение активности фосфатазы сыворотки способом King и King (38). Метод основан на определении количества освобожденного фенола из динатрофенилфосфата при помощи реакции Grifols-Lucasa (25). В щелочной среде, в присутствии окислителя, фенол с 4-аминоантипирином дает красное окрашивание, которое можно определить колориметрически. Определение можно производить без удаления белка из пробы. Сходную реакцию описали Powell и Smith (50). Реакция идет по уравнению:



Реактивы:

1) карбонатный буфер с pH 10,0, 0,1 М: 6,36 г Na_2CO_3 и 3,36 г NaHCO_3 растворяют в 1000 мл H_2O . Буфер с pH 4,9: 21 г кристаллической лимонной кислоты растворяют в 188 мл H NaOH и объем раствора доводят до 500 мл. Проверяют pH и в случае необходимости корректируют его при помощи H NaOH или H HCl . Прибавляют несколько капель хлороформа и хранят в холодильнике;

2) субстрат: 0,01 М динатрифенилфосфат (2,18 г на 1 л воды). Раствор доводят до кипения, быстро охлаждают, прибавляют несколько капель хлороформа и хранят в холодильнике;

3) стандарт фенола: 1 г кристаллического фенола растворяют в 1 л 0,1 Н HCl . Из этого раствора приготавливают два рабочих стандарта, содержащих 0,01 и 0,03 мг фенола в 1 мл. Консервируют, прибавляя несколько капель хлороформа;

4) $\text{H}/2 \text{ NaOH}$;

5) $\text{M}/2 \text{ NaHCO}_3$ (4,2 г в 100 мл воды);

6) 4-аминоантипирин, 0,6% водный раствор;

7) железосинеродистый калий: 2,4 г в 100 мл воды.

Ход исследования: 1 мл буфера (pH 10 для щелочной фосфатазы и pH 4,9 для кислой фосфатазы) и 1 мл субстрата подогревают в водяной бане до температуры 37° и прибавляют 0,1 мл сыворотки. Для определения щелочной фосфатазы инкубируют в течение 15 минут, для определения кислой — 1 час. Затем прибавляют 0,8 мл $\text{H}/2 \text{ NaOH}$ для щелочной фосфатазы (1 мл $\text{H}/2 \text{ NaOH}$ для кислой) и 1,2 мл $\text{M}/2 \text{ NaHCO}_3$ (1 мл для кислой фосфатазы). После этого прибавляют 1 мл 0,6% 4-аминоантипирина, смешивают и прибавляют 1 мл 2,4% железосинеродистого калия. С контрольными пробами поступают таким же образом, с той только разницей, что сыворотку прибавляют после NaOH . Так же приготавливают стандарты, причем вместо 0,1 мл сыворотки берут на 0,1 мл больше соответствующего буфера. Ставят слепую пробу со всеми реактивами и водой вместо фенола. Сразу же после прибавления железосинеродистого калия возникает окрашивание, которое, при хранении пробы в темноте, удерживается в течение 1 часа. Результат определяют при длине волны 510 мμ.

Расчет:

$$\begin{aligned} \text{единицы King-Armstronga}/100 &= \frac{\text{опытная проба} - \text{контроль}}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times \\ &\times 0,01 \text{ (или } 0,03) \times \frac{100}{0,1} = \frac{\text{опытная проба} - \text{контроль}}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10 \text{ (или } 30). \end{aligned}$$

Методика дает результаты, соответствующие методике King и Armstrong (39).

Активность щелочной фосфатазы в норме равна 3—13 единицам, а кислой — 1—5 единицам.

Определение активности кислой фосфатазы предстательной железы в сыворотке, с применением тартрата в качестве ингибитора, по методу King и Jegatheesan (40). Полная инактивация кислой фосфатазы наступает при конечной концентрации тартрата 0,025 М. Анализ следует производить в день взятия крови или в течение 24 часов, при условии хранения пробы в холодильнике.

Реактивы: реактивы те же, что и в предыдущей методике. Дополнительно следует приготовить 1 М раствор L(+) винной кислоты, растворяя 15 г кислоты примерно в 70 мл воды. Затем прибавляют 18,5 мл 10 Н NaOH, доводят pH до 4,9, дополняют водой до 100 мл. Хранят в холодильнике с несколькими каплями CHCl_3 . Аминоантипириновый реактив готовят, смешивая равные количества 0,6% раствора 4-аминоантипирина и 0,5 М NaHCO_3 . Устойчив при хранении в холодильнике в течение 1 месяца.

Ход анализа: готовят три пробирки: А — общая активность, В — активность после инактивации фосфатазы предстательной железы тартратом, С — контроль. В каждую из пробирок отмеривают по 1 мл субстрата и 1 мл буфера. В пробирку В прибавляют 1 каплю тартрата. Подогревают в водяной бане до 37°C и в пробирки А и В прибавляют по 0,1 мл сыворотки. Инкубируют в течение 1 часа, а при высокой активности фосфатазы — меньше. Реакцию прерывают, прибавляя к каждой пробирке по 1 мл 0,5 Н NaOH и смешивая содержимое. В пробирку С прибавляют 0,1 мл сыворотки, а затем во все пробирки по 2 мл аминоантипиринового реактива и 1 мл железосинеродистого калия. Приготавливают стандартную пробу, содержащую 1,1 мл буфера, 1 мл фенолового стандарта (0,01 мг/мл), 1 мл 0,5 Н NaOH, 2 мл аминоантипиринового реактива и 1 мл железосинеродистого калия. Слепую пробу готовят таким же образом, с той только разницей, что вместо фенола берут воду. Результат определяют при длине волны 510 мμ.

Расчет: общая активность кислой фосфатазы в единицах King-Armstrong на 100 мл:

$$\frac{A - C}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10$$

Фосфатаза, инактивированная тартратом, в единицах, как выше:

$$\frac{A - B}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10$$

В эту методику можно также включить определение активности кислой фосфатазы, устойчивой к формолу. Для этого готовят пробу D, как и пробу А, но с прибавлением нейтрализованного формальдегида, pH которого предварительно доводят до 4,9.

$$\text{Активность кислой фосфатазы, устойчивой к формолу} = \frac{D - C}{\text{стандарт} - \text{слепая проба}} \times 10$$

На основании исследования 65 лиц (43 мужчин и 22 женщин), авторы приводят следующие цифры для нормы. Общая активность кислой фосфатазы в среднем равна 1,88 единицам (1,0—4,0), фосфатазы, инактивированной тартратом — 0,335 единиц (0—0,8), а устойчивой к формальдегиду — 1,0 (0,5—1,8). Авторы предлагают считать верхней границей нормы для кислой фосфатазы, инактивированной тартратом, 0,7 единиц.

Методика Bessey, Lowry и Broch определения активности фосфатазы по отношению к п-нитрофенилфосфату (5).

Реактив А: 4,5 г глицина и 95 мг MgCl_2 растворяют в 700—800 мл воды, прибавляют 85 мл 1 Н NaOH и доводят водой до 1000 мл.

Реактив В: 0,4% двунатрий п-нитрофенилфосфат в 0,001 Н HCl. pH раствора должно быть в пределах от 6,5 до 8,0. Если pH выходит из этих границ, то его корректируют при помощи NaOH или HCl. Необходимо проверить субстрат на наличие свободного нитрофенола. Для этого к 1 мл субстрата прибавляют 10 мл 0,02 Н NaOH и определяют экстинкцию при длине волны 415 мμ. При Е большей, чем 0,08 при толщине слоя 1 см следует удалить свободный фенол. Для этого реактив 2—3 раза экстрагируют равным объемом

насыщенного водой бутанола, затем 1 раз насыщенным водой эфиром, после чего эфир удаляют выпариванием. Субстрат хранят в холодильнике. Его можно очистить путем перекристаллизации с 87% этанолом.

Реактив С: смешивают равное количество реактива А и В и в случае надобности доводят рН раствора до 10,3—10,4 при помощи NaOH или HCl. Хранят в холодильнике, лучше всего в замороженном состоянии. Если 2 мл этого субстрата после прибавления 10 мл 0,02 Н NaOH будет иметь экстинкцию E_{415} большую, чем 0,1 (при толщине слоя 1 см), то реактив следует отбросить или экстрагировать бутанолом и эфиром, как описано выше, а затем довести до соответствующего рН.

Стандарты: 1, 2, 4 и 6 μ моля п-нитрофенола на литр (молекулярный вес 139).

Ход исследования: для производства анализа достаточно 5 μ л сыворотки, которую следует отмерить в пробирки 6 \times 50 мм, погруженные в ледяную воду. В каждую пробирку прибавляют 50 μ л холодного реактива С, смешивают и штатив с пробирками ставят в водяную баню с температурой воды 38°. Инкубируют в течение 30 минут и снова охлаждают в ледяной воде. Прибавляют 0,5 мл 0,02 Н NaOH и определяют экстинкцию при 415 м μ (E_1). Затем в каждую пробирку прибавляют 2—4 μ л концентрированной HCl и снова определяют экстинкцию (E_2). $E_1 - E_2 = E$ скорректированная. Стандартную и слепую пробу получают, подвергая 5 μ л стандарта или воды такой же процедуре, как и сыворотку.

Единица активности = 1 μ моль освобожденного п-нитрофенола на 1 литр сыворотки в час. Так как стандартное время инкубации равно 30 минутам, то стандарты с 1, 2, 4 и 6 μ молями на литр соответствуют 2, 4, 8 и 12 единицам. Расчет производят по скорректированным Bodansky. Для анализа можно взять 0,02 мл сыворотки. В этом случае следует прибавить 0,2 мл субстрата и 2 мл NaOH. После первого определения экстинкции прибавляют 1 каплю 5 Н HCl и снова определяют экстинкцию. Если для анализа берут 0,1 мл сыворотки, то прибавляют 1 мл субстрата, а после инкубации — 20 мл 0,02 Н NaOH. Субстрат подогревают в водяной бане и прибавляют сыворотку. NaOH прибавляют через 30 минут от начала реакции, то есть от момента прибавления сыворотки.

При высокой активности фермента сыворотку перед началом реакции следует развести. Описанная методика является точной и очень быстрой.

Тем же методом можно определить активность кислой фосфатазы (2).

Реактивы:

- 1) 0,05 М цитратный буфер с рН 4,8, содержащий двунатрий п-нитрофенилфосфат $7,5 \times 10^{-4}$ М;
- 2) 0,05 Н NaOH.

Ход анализа: 0,2 мл сыворотки и 1,0 мл раствора субстрата инкубируют в течение 30 минут при температуре 37°. Прибавляют 4,0 мл 0,05 Н NaOH и определяют экстинкцию по отношению к контрольной пробе, как указано выше. Количество п-нитрофенола рассчитывают при помощи соответствующего приготовленного стандарта.

Определение активности фосфатаз сыворотки методикой Seligman и сотрудников (61).

Реактивы:

- 1) субстрат: 20 мл β -нафтил-фосфата натрия в 100 мл воды;
- 2) 0,1 М вероналовый буфер с рН 9,1. Смешивают 950 мл 0,1 М мединала (Veronal-Natrium) и 50 мл 0,1 Н HCl;
- 3) 0,2 М ацетатный буфер с рН 4,8. Смешивают 120 мл 0,2 М ацетата натрия с 80 мл 0,2 М уксусной кислоты;
- 4) тетразонат-ди-орто-анизидина. Непосредственно перед употреблением растворяют 4 мг соли на 1 мл. При комнатной температуре раствор стоек только 20—30 минут;
- 5) 0,1 М Na_2CO_3 ;
- 6) 40% трихлоруксусная кислота;
- 7) безводный этилацетат.

Непосредственно перед употреблением смешивают равные количества субстрата и вероналового или ацетатного буфера.

Ход анализа: 1 мл сыворотки из свежеснятой крови разводят в 20 раз дистиллированной водой. К 1 мл разведенной сыворотки прибавляют 5 мл смеси буфера и субстрата и инкубируют при температуре 37,5° в течение 1 часа для щелочной, и двух часов для кислой фосфатазы. Для определения этой последней следует, после окончания инкубации, прибавить 2 капли раствора углекислого натрия, чтобы достигнуть оптимального рН для сочетанной реакции с тетразонатом анизидина. После окончания инкубации к каждой пробирке прибавляют по 1 мл тетразоната-ди-орто-анизидина, смешивают и через три минуты осаждают белок путем прибавления 1 мл трихлоруксусной кислоты. После встряхивания с 10 мл этилацетата осадок отделяют центрифугированием и определяют экстинк-

цию 5 м μ .
Прибавлять
 β -нафтил-
10 мг β -н-
на 100 м μ .
если сыво-

Опр
(16). На
активно
фосфату
фосфату
нозин-5-
ческой
разности
рН 7,5.

Реактив
1) смеси
и 0,424 г
и дополни
2) смеси
бавлением
3) смеси
ряют в во
до 100 мл
Все реа
4) реакт
борроу (18
Ход а
отношени
деляют пу
с 5-АМФ
смеси буф
прерываю
отделения
дившегося
ность вып
фосфатазы
Расчет:
100 мл из
Активность
при рН 7,

1. Abul-F
ski A.: Am.
A. E.: J. Bi
schung 1955
6. Bodansky
1934, 48, 12
1948, 16, 87
G. T., Cori
11. Cori C
Press. 1952,
16, 943. —
1242. — 14.
Biochem. Z.
17. Fantl P.
J. Biol. Chem
1937, 59, 98
21. Franse
A. E.: J. Biol

16 — Клини

цию 5 мл при 540 мμ по сравнению со слепой пробой, содержащей вместо сыворотки воду. Приготавливают стандартную кривую при помощи проб, содержащих от 0,01 до 0,08 мг β-нафтола. В качестве единицы принимают то количество фермента, которое освобождает 10 мг β-нафтола в течение 1 часа при температуре 37,5°C. Для расчета количества единиц на 100 мл сыворотки, следует количество освободившегося нафтола умножить на 2000, если сыворотка для анализа была разведена в 20 раз.

Определение активности 5-нуклеотидазы по Dixon и Purdom (16). Неспецифическая щелочная фосфатаза при pH 9,0 обладает высокой активностью по отношению к фенилфосфату, адениловой кислоте и глицерофосфату. При pH 7,5 отмечается низкая активность по отношению к глицерофосфату и фенилфосфату, а более высокая активность по отношению к аденин-5-монофосфорной кислоте (5-АМФ) приписывается влиянию специфической 5-нуклеотидазы (5-НТ). Поэтому активность 5-НТ сыворотки равна разности общей активности к 5-АМФ и активности к β-глицерофосфату при pH 7,5.

Реактивы:

1) смесь буфера и глицерофосфатного субстрата с pH 9,3: 0,05 г β-глицерофосфата и 0,424 г диэтилбарбитурата натрия (мединала) растворяют в воде, pH доводят до 9,3 и дополняют водой до 100 мл;

2) смесь буфера и субстрата того же состава, pH которого равно 7,5. Получают прибавлением примерно 1,2 мл Н НСl;

3) смесь буфера и субстрата 5-АМФ с pH 7,5: 0,087 г 5-АМФ и 0,424 г мединала растворяют в воде, pH доводят до 7,5, прибавляя примерно 1,2 мл Н НСl, объем дополняют до 100 мл.

Все реактивы хранят в холодильнике;

4) реактивы для определения неорганических фосфатов по методике Фиске и Себорроу (18).

Ход анализа: активность неспецифической щелочной фосфатазы определяют по отношению к β-глицерофосфату натрия при pH 9,3. Активность 5-нуклеотидазы определяют путем инкубации двух проб, одной с β-глицерофосфатом при pH 7,5 и другой с 5-АМФ при pH 7,5. Проба состоит из 0,2 мл сыворотки, которую прибавляют к 4,5 мл смеси буфера и субстрата и 0,3 мл воды. Инкубация продолжается 2,5 часа. Реакцию прерывают прибавлением 1 мл 30% трихлорацетата. Слепую пробу не инкубируют. После отделения осадка белков путем центрифугирования, определяют количество освободившегося неорганического фосфата в 4 мл безбелковой жидкости при 660 мμ. Активность выражается в единицах Bodansky. Приведенная методика определения щелочной фосфатазы заимствована у Shinowara и сотрудников (63).

Расчет: активность щелочной фосфатазы рассчитывают в единицах Bodansky на 100 мл из инкубации, произведенной с β-глицерофосфатным субстратом при pH 9,3. Активность 5-нуклеотидазы рассчитывают из разницы активности сыворотки в единицах при pH 7,5 по отношению к β-глицерофосфату и 5-АМФ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abul-Fadl M. A. M., King E. J.: Biochem. J. 1949, 45, 51. — 2. Andersch M. A., Szczypiński A.: Am. J. Clin. Path. 1947, 17, 571. — 3. Ashmore J., Hastings A. B., Nesbett F. B., Renold A. E.: J. Biol. Chem. 1956, 218, 77. — 4. Beckman R.: Z. f. Vitamin, Hormon und Fermentforschung 1955, 7, 14. — 5. Bessey O. A., Lowry D. H., Brock A.: J. Biol. Chem. 1946, 164, 321. — 6. Bodansky A.: J. Biol. Chem. 1933, 101, 93. — 7. Bodansky A., Jaffe H. L.: Am. J. Dis. Child. 1934, 48, 1268. — 8. Broh-Kahn R. H., Mirsky J. A., Perisutti G., Brand J.: Arch. Biochem. 1948, 16, 87. — 9. Clark L. C. Jr., Treichler P.: Psychosomatic Med. 1950, 12, 261. — 10. Cori G. T., Cori C. F.: J. Biol. Chem. 1952, 199, 661. — 11. Cori C. F.: Carbohydrate Metabolism. Изд. Najjar V. A. Baltimore. John Hopkins Univ. Press. 1952, 3. — 12. Davison Reynolds M., Lemon H. M., Byrnes W. W.: Cancer Res. 1956, 16, 943. — 13. De Duve C., Berthet J., Hers H. G., Dupret L.: Bull. Soc. Chim. Biol. 1949, 31, 1242. — 14. Delory G. E., Hetherington M.: Canad. J. Med. Sc. 1952, 30, 4. — 15. Demuth F.: Biochem. Z. 1925, 159, 415. — 16. Dixon Th. F., Purdom M.: J. Clin. Path. 1954, 7, 341. — 17. Fantl P., Rome M. N.: J. Exp. Biol. and M. Sc. 1945, 23, 21. — 18. Fiske A., Subbarow Y.: J. Biol. Chem. 1925, 66, 375. — 19. Flood C. A., Gutman E. B., Gutman A. B.: Arch. Int. Med. 1937, 59, 981. — 20. Folley S. J., Kay H. D.: Ergebn. Enzymforsch. 1936, 5, 159. — 21. Franseen C. C., McLean R.: Am. J. Cancer 1935, 24, 299. — 22. Freedland R. A., Harper A. E.: J. Biol. Chem. 1957, 228, 743. — 23. Gomori G.: Arch. Path. 1941, 32, 189. — 24. Gomori G.:

- J. Biol. Chem. 1943, 148, 139. — 25. Grifols-Lucas J. A.: Brit. Med. J. 1951, 2, 295, Communication to International Congress of Clinical Pathology. — 26. Gutman A. B., Kasabach H.: Am. J. Med. Sc. 1936, 191, 361. — 27. Gutman A. B., Tyson T. L., Gutman E. B.: Arch. Int. Med. 1936, 57, 379. — 28. Gutman A. B., Olson K. B., Gutman E. B.: J. Clin. Invest. 1940, 19, 129. — 29. Gutman A. B., Gutman E. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1938, 39, 529. — 30. Gutman A. B., Gutman E. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1939, 41, 277. — 31. Gutman E. B., Sproul E. E., Gutman A. B.: Am. J. Cancer 1936, 28, 485. — 32. Heppel L. A., Hilmo R. J.: J. Biol. Chem. 1951, 188, 665. — 33. Hock E., Tessier R. N.: J. Urol. 1947, 57, 172. — 34. Huggins C., Talalay F.: J. Biol. Chem. 1945, 159, 399. — 35. Kalckar H. M., Skand. Arch. Physiol. 1937, 77, 46; Biochem. J. 1939, 33, 631. — 36. Kay H. D.: Brit. J. Exp. Path. 1929, 10, 253. — 37. Kay H. D.: J. Biol. Chem. 1930, 89, 249. — 38. Kind P. R. N., King E. J.: J. Clin. Path. 1954, 7, 322. — 39. King E. J., Armstrong A. R.: Canad. Med. Ass. J. 1934, 31, 376. — 40. King E. J., Jegatheesan K. A.: J. Clin. Path. 1959, 12, 85. — 41. Kirberger E., Martini G. A.: Dtsch. Arch. Klin. Med. 1950, 197, 268. — 42. Kirk J. E., Eisenstein A., Mac Bryde C. M.: J. Clin. Endocrin. and Metab. 1952, 12, 338. — 43. Kutscher W., Wolbergs H.: Z. physiol. Chem. 1935, 236, 237. — 44. Langdon R. G., Weakley D. R.: J. Biol. Chem. 1955, 214, 167. — 45. Lundsgaard E.: Biochem. Z. 1933, 264, 221. — 46. Martini G. A., Weidemann J.: Z. f. exp. Path. u. Therap. 1952, 119, 89. — 47. McCune D. J., Mason H. H., Clarke H. T.: Am. J. Dis., Child. 1943, 65, 81. — 48. Meyerhof O., Green H.: J. Biol. Chem. 1949, 178, 655, 1950, 183, 377. — 49. Ostrowski W., Tsugita Akira: Arch. Biochem. Bioph. 1961, 94, 68. — 50. Powell M. E. A., Smith M. J. N.: J. Clin. Path. 1954, 7, 245. — 51. Reis J.: Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 1940, 16, 385. — 52. Reis J.: Ibid. 1940, 22, 36. — 53. Reis J.: Biochem. J. 1951, 48, 548. — 54. Reis J.: Postepy Biochemii 1958, 4, 95. — 55. Roberts W. M.: Brit. J. Exp. Path. 1930, 11, 90. — 56. Robison R.: Biochem. J. 1923, 17, 286. — 57. Roche J.: The Enzymes Edit. Sumner J. B. a. Myrback K. I/1 473, Academic Press N. Y. 1952. — 58. Rosenberg I. N.: J. Clin. Invest. 1959, 38, 630. — 59. Schlamowitz M., Bodansky O.: J. Biol. Chem. 1959, 234, 1433. — 60. Scott W. W., Huggins C.: Endocrinology 1942 30, 107. — 61. Seligman A. M., Chauncey H. H., Nachlas M. M., Manheimer L. H., Ravin H. A.: J. Biol. Chem. 1951, 190, 7. — 62. Shay H., Siple H.: J. Lab. Clin. Med. 1954, 43, 741. — 63. Shinowara G. Y., Jones L. M., Reinhart H. L.: J. Biol. Chem. 1942, 142, 921. — 64. Smith J., Maizels M.: Arch. Dis. Child. 1932, 7, 149. — 65. Smith O. N., Mitchell J. M.: Am. J. Med. Sc. 1935, 190, 765. — 66. Suzuki U., Yoshimura Y., Takaishi M.: Tokyo Imp. Univ. Coll. Agric. Bull. 1907, 7, 503. — 67. Swanson M. A.: J. Biol. Chem. 1950, 184, 647. — 68. Valentine W. N., Folette J. H., Hardin E. B., Beck W. S., Lawrence J. S.: J. Lab. Clin. Med. 1954, 44, 219. — 69. Walker B. S., Lemon H. M., Dawson M. M., Schwartz M. K.: Am. J. Clin. Path. 1954, 24, 807. — 70. Woodard H. Q.: Cancer, 1952, 5, 236.

ФЕРМЕНТЫ, ГИДРОЛИЗИРУЮЩИЕ ЭФИРЫ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

MARIAN ORŁOWSKI

ОБЩИЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Ферменты, относящиеся к этой группе, катализируют гидролиз эфирной связи между карбоксильной группой органических кислот и одно- или многоатомными спиртами. К этой группе относятся ферменты с невысокой специфичностью, такие как липазы и очень разнообразные эстеразы, гидролизующие эфиры одно- или многоатомных спиртов и наряду с ними — ферменты с более узкой специфичностью, как, например, холестеролэстераза, действующая на эфиры холестерола, фосфолипаза, действующая на фосфолипиды, и так далее. Экстракты почти из всех тканей обладают способностью разлагать простые эфиры, однако неизвестно количество индивидуальных эстераз в тканях, тем более, что до сих пор не удалось изолировать их и очистить. Неизвестны также физиологические субстраты для этих ферментов. Некоторые протеазы, такие как трипсин, химотрипсин и карбоксипептидаза, также обладают способностью разлагать эфиры.

Классификация эстераз встречается с трудностями: специфичность отдельных ферментов часто совпадает таким образом, что несколько ферментов расщепляют один и тот же субстрат. Большинство авторов оставляет название „липаза“ для фермента, атакующего эфиры жирных кислот с длинной цепью,

то есть триглицериды этих кислот. Триглицериды жирных кислот считаются обычными субстратами для липазы. Название „алиэстераза“ или эстераза, оставлено для фермента, гидролизующего алифатические эфиры с короткой цепью, например, бутират метила. Однако это деление не является абсолютным, так как липаза поджелудочной железы, например, кроме триглицеридов жирных кислот с длинной цепью разлагает также триацетин и трибутирин, а печеночная эстераза, которая, казалось бы, не разлагает истинных жиров, гидролизует ароматические и алифатические эфиры жирных кислот с длинной цепью быстрее, чем соответствующие эфиры жирных кислот с короткой цепью. Поэтому возникло предложение, чтобы критерием классификации являлась растворимость или нерастворимость субстрата. С этой точки зрения липаза была бы ферментом, действующим на нерастворимый субстрат, а собственно эстераза — на растворимый субстрат. Реакции, катализируемые липазой и эстеразой, приводят к установлению состояния равновесия между эфиром и продуктами его гидролиза. В определенных условиях, в среде, содержащей спирт, карбоновую кислоту и фермент, можно обнаружить реакцию синтеза соответствующих эфиров под влиянием фермента.

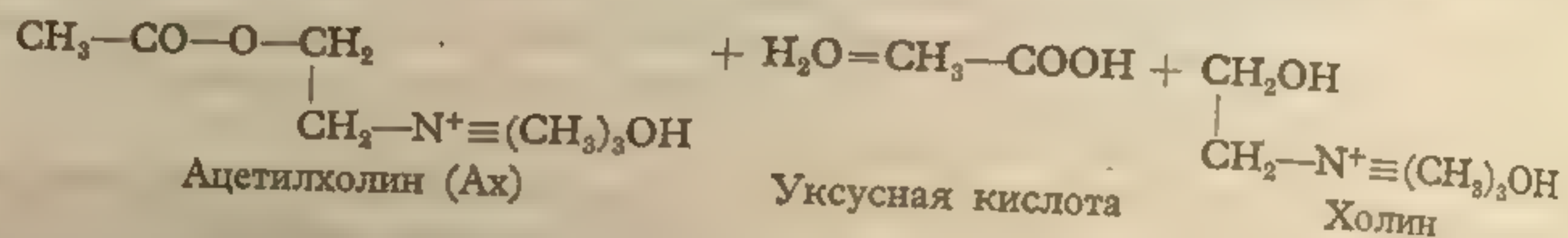
Механизм гидролизующего действия эстераз заключается, как установлено в последнее время (114), в исследованиях над холинэстеразой, в образовании промежуточной, ацилированной формы фермента в реакции между ферментом и субстратом. Эта форма фермента в дальнейшем может вступать в реакцию с различными акцепторами, причем в условиях обычного эксперимента акцептором является вода, но им может быть например какой-нибудь спирт. Такая же форма ацилированного фермента образуется и в обратной реакции, синтеза эфирной связи.

Если ацилированная форма фермента образуется очень легко и в присутствии воды не наступает ее быстрое разложение, тогда эфир действует как ингибитор при ферментном гидролизе других субстратов, так как он как бы блокирует „центр активности“ фермента. Этим механизмом объясняется действие ряда ингибиторов эстераз. В „центре активности“ ферментов важную роль играет молекула серина, и наряду с ней вероятно щелочная молекула гистидина. После реакции холинэстеразы с сильным ингибитором — диизопропилфторфосфатом, а затем деградации фермента, выявлено, что молекула ингибитора была связана с гидроксильной группой серина. Сходный механизм действия выявлен для специфической холинэстеразы и холинэстеразы сыворотки, а также для трипсина, химотрипсина, тромбина и фосфоэстеразы (27, 60, 93, 98).

В сыворотке человека ферментом с наибольшей эстеролитической активностью является холинэстераза (ранее она называлась псевдохолинэстеразой). Липаза со свойствами липазы поджелудочной железы, то есть фермента, гидролизующего истинные жиры и растительные масла, в нормальных условиях в человеческой сыворотке не встречается, или она имеется в таком незначительном количестве, что ее с трудом можно обнаружить. Этот фермент появляется при заболеваниях поджелудочной железы. В физиологических условиях отсутствует также липопотеиновая липаза, или отмечается лишь незначительная ее активность; этот фермент в большом количестве появляется в сыворотке после введения гепарина. По мнению Ravin и сотрудников (96), значительный процент эстеролитической активности сыворотки связан с ферментом, устойчивым к эзерину. Кроме этих ферментов в сыворотке постоянно имеется холестеролэстераза, приводящая при хранении сыворотки к уменьшению количества свободного холестерина и увеличению количества эфиров. Обнаружено также наличие в сыворотке небольшой активности фосфолипазы А.

ХОЛИНЭСТЕРАЗА (Хэ)

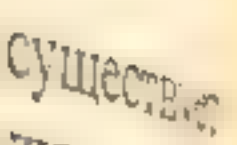
Холинэстеразы называются ферменты, которые быстрее расщепляют эфиры холина, чем другие эфиры. Основное различие между разными холинэстеразами и обычными эстеразами (алиэстеразой, арилэстеразой и другими) заключается вероятно в чувствительности холинэстераз к эзерину, который полностью инактивирует фермент в концентрации 10^{-5} М. Способность разложения ацетилхолина кровью впервые отметил Plattner (95). Loewi и Navratil (69) установили, что этот процесс вызван ферментом, содержащимся в крови, а название холинэстеразы ввел Stedman и его сотрудники, которые исследовали фермент, обладающий этими свойствами, в сыворотке крови лошади (105).



При дальнейших исследованиях (1, 75) оказалось, что в крови существует по крайней мере два фермента, разлагающих ацетилхолин (Ах), один в эритроцитах, а другой в сыворотке. Эти ферменты отличаются друг от друга рядом свойств, причем фермент, содержащийся в эритроцитах, называется истинной холинэстеразой, или ацетилхолинэстеразой (АХэ) (Холинэстераза I), а фермент, содержащийся в сыворотке — неспецифической холинэстеразой (Хэ) (Холинэстераза II), иногда же бутирил- или пропионилхолинэстеразой. Истинная холинэстераза — ацетилхолинэстераза (АХэ) прежде всего находится в эритроцитах, нервной ткани — в симпатических и парасимпатических узлах и в терминальных двигательных бляшках. В различных отделах нервной системы имеется разное количество АХэ, причем большое количество фермента имеется в экстрапирамидных центрах. После перерезки преганглионарных волокон наступает уменьшение активности АХэ в соответствующих нервных клетках и нервах. Ацетилхолинэстераза разлагает ацетилхолин и изомер D ацетил-β-метилхолина, и не гидролизует, или гидролизует очень медленно бензоил-, пропионил- и бутирилхолин, а также эфиры, содержащие холина (9). Оптимум pH АХэ равен 7,5—8,0, причем, при высокой концентрации ацетилхолина в среде, наступает торможение фермента. Система АХэ—Ах, а также холинацетилаза (фермент, синтезирующий Ах), необходимы для переноса нервных импульсов. Блокада этой системы приводит к смерти. Наиболее чистый препарат АХэ получен из электрического органа угря *Electrophorus electricus*, и обладал активностью примерно 7×10^3 μмолей Ах, гидролизованной в течение 1 минуты 1 миллиграммом ферментного белка при температуре 25°, при pH 7,0 и 0,003 М концентрации Ах. Фермент обладает очень высокой молекулярной массой, предположительно 12×10^6 (64), причем число оборотов тоже очень высокое. На основании экспериментов с ингибиторами принимают, что молекула фермента имеет 30—50 „центров активности“.

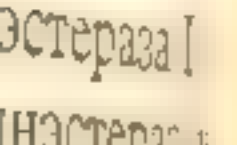
Механизм действия АХэ исследовали Вильсон и его сотрудники (114, 115, 116). По мнению этого автора центр активности фермента состоит из двух частей, одной анионозой, от которой зависит специфичность фермента, и другой, ферментной, обуславливающей гидролитическую функцию фермента. Ниже представлен схематически „центр активности“ АХэ и комплекс фермента с субстратом.

После соединения фермента с Ах наступает ацетилирование фермента и удаление молекулы холина. Ацетилфермент принимает затем молекулу воды

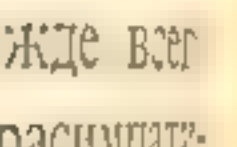
$(\text{CH}_2)_n\text{OH}$ 

ДН В ЗР
Г ОТ

HA3LIBA:3

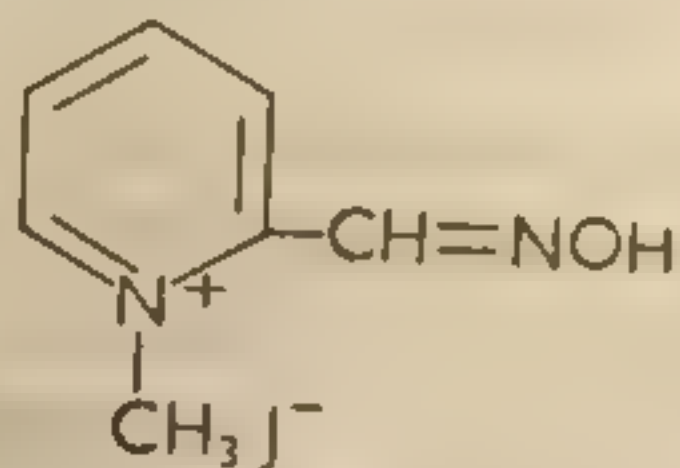


ИЗСТЕРАЖЪ



Алкилофосфаты инактивируют фермент путем фосфорилирования эстеразной части центра активности. В отличие от комплекса ацетилфермент, который быстро диссоциирует под влиянием воды, комплекс фермент-алкилофосфат диссоциирует очень медленно и реактивация фермента продолжается длительное время. Соединения, инактивирующие ацетилхолинэстеразу, нашли применение в качестве боевых отравляющих веществ, под названиями Табун, Зарин и так далее. (Более подробные сведения о фосфорорганических соединениях и механизме их действия можно найти в польской литературе 54, 106, 68).

Инактивация ацетилхолинэстеразы приводит к накоплению в организме ацетилхолина с симптомами отравления им и парасимпатикотонией, часто приводящей к смерти. Противоядием в этих случаях является 2-РАМ (йодметил пиридин-2-альдоксим).



Это соединение, входя в реакцию с молекулой ингибитора, вызывает реактивацию фермента. Алкилофосфаты инактивируют кроме холинэстеразы, также ряд других ферментов, обладающих такими же центрами активности и механизмом действия, например, трипсин и химотрипсин. Ацетилхолин инактивируется также рядом тетрааммониевых оснований. Последние действуют путем электростатической связи с анионной частью центра активности холинэстеразы, которая в нормальных условиях связывает катионную часть ацетилхолина.

В отличие от АХэ, неспецифическая холинэстераза (Хэ) встречается в сыворотке, печени, поджелудочной железе и других тканях. Ее оптимум рН равен 8,5. Фермент этот не инактивируется избытком субстрата, и разлагает бутирилхолин в 2—3 раза быстрее, чем Ах. Хэ разлагает также другие эфиры холина, как бензоилхолин, и эфиры, не содержащие холина, как трибутирин и триацетин. Этот фермент не разлагает ацетил-β-метилхолин. Хэ разлагает также двойные эфиры холина с дикарбоновыми кислотами, причем скорость гидролиза увеличивается от эфиров янтарной кислоты вплоть до двойного эфира себаценовой кислоты (C₁₀). Сукцин-ди-холин часто применяют в качестве препарата, снижающего мышечный тонус. Он является ингибитором АХэ и быстро разлагается холинэстеразой, которая охраняет нервную систему от этого ингибитора. В некоторых случаях в качестве причины отравлений, наблюдающихся после введения этого препарата, указывают на врожденный низкий уровень холинэстеразы сыворотки. Поэтому, перед применением этого препарата, следует определить активность Хэ сыворотки.

Ионы Mg⁺⁺, Ca⁺⁺ и Mn⁺⁺, а также GSH и цистеин, активируют Хэ. Ингибиторы, инактивирующие АХэ, действуют таким же образом и на Хэ. Некоторые соединения, особенно из группы тетрааммониевых оснований, оказывают сильное инактивирующее действие на АХэ и Хэ. Селективными ингибиторами АХэ являются соединения, называемые Nu-1250 (45), 297C50 (13, 109), 3116 СТ (32).

Kalow и Genest (50) заметили различную чувствительность Хэ разных лиц к дибукаину, ингибитору Хэ сыворотки человека. Существует три типа инактивации при помощи этого ингибитора: обычный, косвенный и атипичный. Атипичная инактивация имеет место в 0,02% случаев. При семейных исследова-

дованиях оказалось, что этот тип действия фермента имеет генетическую основу. Предполагается, что существуют два аутосомных аллеля рецессивного типа, каждый из которых отвечает за возникновение определенного типа Хэ. Разница между ферментами заключается в разном строении центра активности и, особенно, анионной его части.

Существует ряд соединений, вызывающих преходящее уменьшение активности Хэ в сыворотке. Из наиболее известных следует назвать кортизон, эстрогены, атропин, морфин, гиостамин, кодеин, кофеин, барбитураты, антигистаминовые и антималярийные препараты, резерпин. Сходным образом действуют некоторые витамины, такие как витамин К и В₁. Из других соединений следует назвать эрготамин, метиленовую синьку, бриллиант-крезиловую синьку, многие наркотики, курара, желчные кислоты, препараты, служащие для местного обезболивания, а также лекарственные вещества из группы фенотиазина (16, 20, 52, 61).

В эстеразной части Хэ молекула серина играет важную роль в активности фермента. После инактивации сыворотки при помощи диизопропилфторфосфата, содержащего радиоактивный фосфор, и деградации фермента, фосфор всегда был связан с гидроксильной группой серина. Строение пептида, изолированного из Хэ лошадиной сыворотки, инаktivированного при помощи ДФФ, представляется следующим образом (согласно исследованиям группы Cohen) (49):

Фе. Гли. Глю. Сер. Ала. Гли. (Ала₂, Сер)

|
Р

Порядок этих аминокислот очень сходен с порядком их около ДФФ центров активности химотрипсина, трипсина и тромбина, связывающих ДФФ, и ничем не отличается от порядка аминокислот в центре активности алиэстеразы лошадиной сыворотки.

Активность холинэстеразы в сыворотке колеблется в довольно широких пределах, но у одного и того же человека активность эта довольно постоянна (3, 51). Активность фермента не зависит от диеты, возраста и веса тела. Не отмечено также колебания активности после приема пищи. У новорожденных отмечается меньшая активность Хэ, однако в течение 8 первых дней жизни она увеличивается, достигая постоянной нормальной величины (65). В последнее время Augustinsson приводит более низкую активность фермента у женщин (11).

Основное значение имеет определение активности Хэ сыворотки при заболеваниях печени. Это связано с тем, что, как принято считать, Хэ вырабатывается в печени и отсюда поступает в кровь. О печеночном происхождении фермента свидетельствуют экспериментальные и клинические данные. Отравление ССl₄ вызывает у подопытных животных кратковременное увеличение активности Хэ сыворотки, после чего наступает длительное падение активности фермента ниже нормального уровня. Это объясняется тем, что вначале распад печеночных клеток вызывает поступление в кровь большого количества фермента, что является причиной первоначального увеличения активности Хэ, а наступающее затем уменьшение активности является следствием расстройства синтеза этого фермента в печени. Гистохимическим анализом удалось обнаружить наличие Хэ в цитоплазме печеночных клеток (33). После удаления печени активность Хэ падает до нуля. Изменения активности Хэ сыворотки часто протекают параллельно изменениям уровня альбуминов в крови, а роль печени в синтезе альбуминов может являться косвенным доказательством печеночного происхождения фермента (31, 63). Этот параллель-

лизм имеет место, однако, только при заболеваниях печени, при нефрозах же несмотря на низкий уровень альбуминов, отмечается высокая активность Хэ. Это зависит от потери альбуминов через почки, которые, несмотря на патологический процесс в них, являются непроницаемыми для крупной молекулы фермента. Альбуминная фракция сыворотки обладает активностью Хэ, что обнаружил уже Kowarzyk (61). При более поздних электрофоретических исследованиях оказалось, что основная часть фермента перемещается с α и β глобулиновой фракцией (12, 81).

При клинических исследованиях установлено, что активность Хэ уменьшается при заболеваниях, протекающих с поражением паренхимы печени, таких как паренхиматозный гепатит, цирроз печени (8, 25, 113), а также при застойной печени (91), вызванной недостаточностью кровообращения. Снижение активности Хэ отмечается также при первичном и метастатическом раке печени, на первой неделе после инфаркта миокарда (90), при злокачественных новообразованиях, протекающих с кахексией. Снижение активности фермента имеет место также при острых инфекционных заболеваниях, после хирургических операций, при токсикозах беременности. Имеются сообщения об очень низкой активности фермента при дерматомиозите (79). Активность Хэ снижается при анемии, а активность АХэ эритроцитов увеличивается при анемиях, сопровождающихся усиленной регенерацией крови (55).

Увеличение активности Хэ отмечается при нефрозах (63, 112), гипертонии (92), сахарном диабете и гипертиреозе (26). В сыворотке человека и разных животных имеются ферменты, которые обладают способностью гидролизировать различные эфиры алкалоидов. При этом существует видовое различие в способности разложения эфиров разных алкалоидов. Эти ферменты или идентичны или очень сходны с неспецифической Хэ сыворотки. Атропин разлагается до тропина и троповой кислоты (17), подобным же образом разлагаются ферментами гомотропин, тропококаин и кокаин. Ферменты, содержащиеся в сыворотке, разлагают также прокаин (прокаинэстераза), героин, долантин и другие (34, 53, 18). Прокаинэстераза и Хэ — это один и тот же фермент (25).

ЛИПАЗА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Лп)

Этот фермент отличается способностью гидролизировать истинные масла и жиры, причем он действует также на растворы или взвеси таких низкомолекулярных эфиров, как бутират метила, и эфиры глицерина с жирными кислотами, имеющими короткую цепь, как триацетин. Панкреатическая липаза очищена до степени белка однородного по хроматографическим и электрофоретическим данным (73). Триглицериды гидролизуются быстрее, чем двуглицериды, а эти в свою очередь быстрее, чем моноглицериды. Эфиры, содержащие жирные кислоты с цепью, более короткой, чем C_7-C_{10} , гидролизуются медленнее (14, 101). Фермент активируется желчными кислотами, причем предполагается, что это вызвано эмульгирующим действием последних, а не непосредственным влиянием на фермент (113). Активирующим свойством обладают также альбумины, соли кальция (вероятно как вещества, связывающие освободившиеся жирные кислоты), а также аминокислоты и пептиды, среди которых наиболее активным является L-лейцил-глицил-глицин. Хинин инактивирует фермент, атоксил не оказывает влияния на его активность. Лп является относительно устойчивой к действию таких органических соединений фосфора, как диизопропилфторфосфат. Однако под влиянием диэтил-нитрофенилфосфата происходит постепенная инактивация фермента (82). Оптимум рН липазы равен примерно 9,0.

В физиологических условиях липолитическая активность сыворотки невелика, и, вероятно частично вызвана липопротеиновой липазой (70). Также и активность панкреатической липазы в сыворотке, если она вообще существует, очень незначительна. Зато фермент со свойствами панкреатической липазы несомненно появляется в сыворотке при остром панкреатите, и в этих случаях анализ активности его может иметь диагностическое значение. Также и в моче отмечается активность липазы панкреатического происхождения: активность ее увеличивается после перевязки выводного протока поджелудочной железы, а также после введения секретина и мехолила (87), и уменьшается после панкреатэктомии. Увеличение активности фермента наблюдается при заболеваниях поджелудочной железы. При раке поджелудочной железы и хроническом панкреатите отмечается снижение активности фермента в моче и отсутствие реакции на введение секретина (88).

Методику гистохимической локализации липазы разработал Gomori. Она заключается в превращении освобождающихся во время ферментной реакции жирных кислот в нерастворимые соли кальция, а затем в соли свинца. Места отложения этих солей темнеют под воздействием H_2S (36).

Определение активности липазы сыворотки имеет диагностическое значение при заболеваниях поджелудочной железы, и прежде всего при острых панкреатитах (41, 42).

АЛИЭСТЕРАЗЫ — КАРБОКСИЛЭСТЕРАЗА

Ферменты этого типа распространены во всех тканях, причем, наиболее характерным является фермент из печени. Алиэстераза разлагает простые эфиры, например, бутират метила, а также такие эфиры глицеринов с короткими цепями жирных кислот, как трибутирин, но не гидролизует истинных масел и жиров. Оптимум pH этого фермента равен 8,0—9,0. Ряд таких соединений, как атоксил, алкалоиды, кофеин, никотин, шлокарпин а также адреналин и тироксин, инактивируют фермент. В отличие от панкреатической липазы, этот фермент инактивируется желчными кислотами. Для определения активности фермента в качестве субстрата чаще всего пользуются метилбутиратом. Хинин не влияет на активность фермента.

Активность фермента трудно дифференцировать с активностью неспецифической холинэстеразы сыворотки. Уменьшение активности фермента в сыворотке наблюдается при алиментарной дистрофии, у больных со злокачественными новообразованиями (80, 46, 97). При эпидемическом гепатите активность фермента не изменяется.

ЛИПОПРОТЕИН-ЛИПАЗА (CF)

В 1943 году Nahn (43) заметил, что введение гепарина собакам, у которых была вызвана алиментарная липемия, приводит к просветлению мутной липемической плазмы. Прибавление гепарина к липемической плазме *in vitro* не приводит к ее просветлению. Этот эффект можно получить *in vitro*, прибавляя к мутной плазме плазму человека, которому предварительно был введен внутривенно гепарин. Фактор, просветляющий мутную липемическую плазму, появляющийся в крови после внутривенного введения гепарина, назван фактором просветления, clearing factor (CF) (4). Реакция просветления является ферментной реакцией, при ней появляются свободные жирные кислоты (5), а фермент, который вызывает это явление, по своему характеру является липазой. Он встречается во многих тканях, а особенно в сердце и жировой ткани, которая является богатым источником этого фермента (56).

Так как соответствующим субстратом для фермента являются жиры, соединенные с белками в липопротеиновые комплексы, фермент этот был назван липопротеин-липазой.

CF удалось очистить 400—500-кратно (89, 47). Оптимум pH его лежит между 7,1—7,6 (71). Действие фермента активизируют ионы кальция и альбумины, что объясняется тем, что они связывают освободившиеся во время реакции свободные жирные кислоты, которые инактивируют фермент (57, 58). Во время реакции в сыворотку освобождаются жирные кислоты и глицерин, причем, меньшее количество глицерина, освободившегося во время реакции, чем жирных кислот, указывает на то, что промежуточными продуктами реакции являются моно- и диглицериды. Реакция просветления прекращается почти полностью тогда, когда примерно 7—8 молей жирных кислот окажется связанными с 1 молем альбуминов (6). Возможно, что гепарин является коферментом CF. Об этом свидетельствует активизирующее действие его на CF в тканях и инактивация фермента гепариной бактериальной происхождения, разлагающей гепарин (57, 59). Фермент инактивирует сернистый калий, высокие концентрации солей (NaCl , Na_2SO_4 , MgCl_2 , MgSO_4), E 600 диэтил-п-нитрофенил-фосфат (10^{-3} M), тетраэтил пирофосфат (10^{-3} M), азур А (0,5 мг/мл), гликохолевый натрий (5×10^{-3} M), атоксил (10^{-2} M) (58, 67, 83), L-тироксин (103). CF отличается от панкреатической липазы, причем эта разница прежде всего проявляется в действии ингибиторов. Сульфат протамина и высокие концентрации солей сильно инактивируют CF, и не действуют на липазу поджелудочной железы (48). NaF и хинин сильно инактивируют липазу поджелудочной железы и значительно слабее CF. Также дезоксихолан инактивирует CF в отличие от липазы поджелудочной железы, которую он активизирует (40). В физиологических условиях сыворотка практически не содержит активного липолитического фермента. Следы липолитической активности в нормальной сыворотке происходят вероятно главным образом от липопротеин-липазы, а в меньшей степени (если вообще имеет место) от панкреатической липазы (70, 30). Экспериментальный шок, вызывая появление в крови эндогенного гепарина, часто вызывает появление в плазме CF (66, 44).

Многие авторы приписывают CF значение в патогенезе атеросклероза у человека. Об этом свидетельствуют наблюдения о том, что активность этого фермента в сыворотке, после введения гепарина у больных с атеросклерозом, бывает более низкой, чем у здоровых людей (19, 23, 117, 107). По мнению некоторых авторов, активность CF у больных не отличается от активности у здоровых, но в сыворотке группы больных наблюдается увеличенное количество ингибитора CF по сравнению с группой здоровых (7). Печень вероятно является органом, удаляющим CF из кровяного русла, о чем свидетельствует меньшая активность фермента в печеночных венах и увеличенная активность в сыворотке больных с циррозом печени и после экспериментального повреждения печени (24).

ХОЛЕСТЕРОЛЭСТЕРАЗА (Хэ)

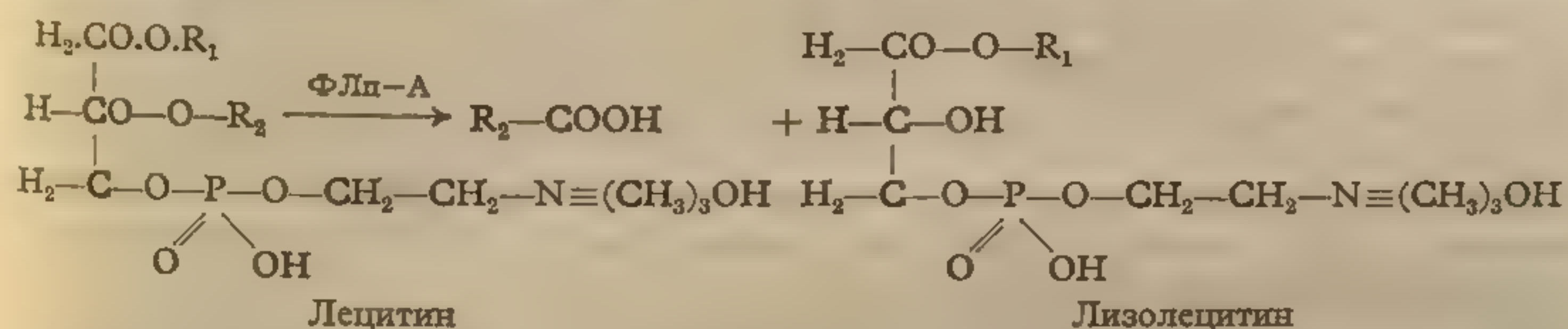
Этот фермент имеется в нормальной сыворотке и от него зависит уменьшение количества свободного холестерина и соответствующее увеличение количества холестероловых эфиров при хранении сыворотки (104). Хэ имеется в поджелудочной железе, печени, почках, желчи и так далее. Активность Хэ поджелудочной железы проявляется только в присутствии свободных желчных кислот. Синтез холестероловых эфиров происходит легче с жирными кислотами, обладающими длинной цепью, а гидролизу легче под-

вергаются эфиры жирных кислот с короткой цепью. Фермент поджелудочной железы был очищен 400-кратно. Установлено, что он сильнее способствует этерификации с ненасыщенными жирными кислотами, например, с олеиновой и линоловой, чем с насыщенными жирными кислотами.

Фермент в сыворотке не активируется жирными кислотами, а даже инактивируется ими. Активность уменьшается в гемолизированной сыворотке. Турнер и сотрудники (110) определяли активность Хэ путем определения свободного и общего холестерина методикой Shoenheimer и Sperry (99) перед и после инкубации сыворотки в течение 24 часов при температуре 37°C. Мерой активности фермента является уменьшение количества свободного холестерина в пользу его эфиров. Авторы выражали активность фермента в единицах, как процент падения количества свободного холестерина. У 20 здоровых людей уменьшение количества свободного холестерина составляло от 31 до 50% (31—50 единиц). Уменьшение активности фермента наблюдалось при заболеваниях печени (21), причем этот анализ может иметь прогностическое значение, так как очень небольшая активность Хэ является плохим прогностическим признаком (110).

ФОСФОЛИПАЗА А (ФЛп-А)

Фосфолипазы — ферменты, отщепляющие остатки жирных кислот от таких фосфолипидов, как лецитин, кефалин, сфингомиелин и других. ФЛп-А действует на молекулу лецитина или кефалина, отщепляя остаток ненасыщенной жирной кислоты при β углероде глицерина. Продуктом реакции является лизолецитин, сильно гемолизирующий эритроциты, или лизокефалин. Под влиянием другого фермента, фосфолипазы В, происходит отщепление оставшейся молекулы жирной кислоты с образованием глицеро-фосфо-холина или глицеро-фосфо-этаноламина.



ФЛп-А находится в поджелудочной железе, откуда она была получена в чистом виде (38); она отличается значительной термоустойчивостью. Кроме того ФЛп-А имеется в сердце, печени и мышцах (94). Наиболее богатым источником ФЛп-А является яд некоторых змей. Фермент находится также в содержимом двенадцатиперстной кишки и в человеческой сыворотке (118, 111). ФЛп-А активируется дезоксихоланом натрия и разными аминокислотами, особенно глицином. Оптимум рН равен 8,4—8,5. Фермент резко инактивируется ЕДТА. Инактивирует его также аскорбиновая кислота, кальций, магний, оксалаты и диэтил-эфир. Увеличение активности фермента имеет место у больных с острым панкреатитом (118).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Имеется много способов определения активности холинэстеразы (76). В биологических методах воздействуют ферментом на известное количество Ах и через определенное время прерывают ферментную реакцию, а количество

оставшегося неразложенного Ах определяют биологически на изолированном кишечнике или сердце лягушки. Химические методы заключаются в основном в определении путем титрования образующейся во время реакции уксусной кислоты, измерения колебаний рН, наступающих в среде реакции, или манометрией. В последнем способе измеряют количество CO_2 , вытесненного из карбонатного буфера под влиянием уксусной кислоты, образующейся во время ферментной реакции.

Манометрический способ определения активности холинэстеразы в аппарате Варбурга (Ammon) (2, 3). В этой методике пользуются аппаратом Варбурга для измерения количества CO_2 , образующегося из карбонатного буфера под влиянием уксусной кислоты, освободившейся во время ферментной реакции. В главную часть сосуда Варбурга отмеривают 1,5 мл 0,5% раствора Ах, насыщенного смесью 5% CO_2 и 95% N_2 , в жидкости Рингера, содержащей бикарбонаты (100 мл 0,9% NaCl , 2 мл 1,15% KCl , 2 мл 1,22% CaCl_2 и 20 мл 1,3% NaHCO_3). В боковое плечо сосуда отмеряют 0,5 мл фермента. При определении активности в сыворотке или крови 0,2 мл пробы разводят в 10 мл жидкости Рингера и 0,5 мл этого разведения берут для реакции. Конечная концентрация субстрата равна 0,375%, а сыворотки 0,5%. Сосуды насыщают смесью газов 5% CO_2 и 95% N_2 , а затем помещают в термостат при температуре 37,5°. По истечении 10—15 минут после того, как температуры выравнялись, и при скорости встряхиваний 100—120 в минуту, смешивают содержимое бокового плеча с содержимым главной части сосуда и в течение часа измеряют количество выделяющегося CO_2 , фиксируя показания манометра каждые 10 минут. Полученное количество корректируют на величину гидролиза собственной субстанции, которую определяют в параллельном сосуде, содержащем все ингредиенты смеси, входящей в реакцию, за исключением сыворотки. Количество CO_2 , выделившееся в течение 1 часа, является показателем активности фермента.

Манометрический способ определения активности холинэстеразы сыворотки и ацетилхолинэстеразы эритроцитов в аппарате Варбурга (Augustinsson) (12, 10). Для определения фермента сыворотки в качестве субстрата применяют бутирилхолин, а фермента эритроцитов — ацетил- β -метилхолин (мехолил). Активность фермента выражается в количестве $\mu\text{л CO}_2$, освободившегося во время реакции, после поправки на собственный гидролиз субстрата.

0,05 мл крови, взятой проколом мякоти пальца, наносят на фильтровальную бумагу (Munktell или Ватман). Сушат при комнатной температуре (примерно 30°). При хранении проб в этом виде в холодильнике они не теряют активности в течение 1—2 месяцев. Для каждого полного анализа необходимо взять четыре одинаковые пробы крови.

Буферный раствор приготавливают, смешивая 100 мл 0,9% NaCl , 30 мл 1,26% NaHCO_3 и 2,0 мл 1,76% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Раствор насыщают смесью газов 95% N_2 и 5% CO_2 . Буфер меняют каждые 2—3 дня.

Раствор субстратов: приготавливают запасные растворы йодида бутирилхолина (BuCh) и йодида ацетил- β -метилхолина (MeCh) путем растворения в разведенном HCl — рН 4,0. При этом рН растворы стойки в течение нескольких месяцев. Концентрация BuCh равна 7,3%, а MeCh 7,15%. Непосредственно перед производством анализа запасные растворы разводят 4 частями бикарбонатного буфера. Конечная концентрация в реагирующей смеси (3,0 мл) равна для BuCh $6,47 \times 10^{-3}$ М, а для MeCh $6,64 \times 10^{-3}$ М. Самостоятельный гидролиз для BuCh равен 3, для MeCh — 4 в течение 30 минут, и на эти величины следует внести поправку в полученные результаты.

Ход исследования: для каждого определения берут одну пробу крови. Эту пробу вырезают из фильтровальной бумаги, разрезают на мелкие кусочки и переносят в главную часть сосуда Варбурга, куда затем отмеривают 2,6 мл бикарбонатного буфера. В боковой сосуд отмеривают 0,4 мл раствора субстрата. С каждым субстратом производят два определения. После присоединения сосудов к манометру их помещают в баню термостата,

при температуре 25°. Насыщают все сосуды смесью газов приведенного выше состава и после того, как температура выравнивается, начинают реакцию, смешивая содержимое главной части сосуда с субстратом бокового сосуда. Каждые 5—10 минут отмечают количество выделенного CO_2 в течение 35—40 минут. Вносят поправку на показания термометра, содержащего 3,0 мл воды. Показателем активности фермента является количество выделенного в течение 30 минут CO_2 . Это количество можно легко заменить на $\mu\text{моль}$ разложенного субстрата, путем деления на 22,4. Для пересчета активности на объем сыворотки или эритроцитов необходимо произвести определение гематокрита при взятии проб крови для анализа.

Автор приводит следующие величины активности фермента:

Фермент/субстрат		Плазма BuCh		Эритроциты MeCh	
Пол		Мужчины	Женщины	Мужчины	Женщины
$\mu\text{л CO}_2$ на 0,05 мл полной крови и 30 мин.	Количество исследованных	141	60	116	47
	среднее	75,5	67,2	35,4	31,4
	среднее квадратное отклонение	14,7	18,0	4,7	4,9
$\mu\text{л CO}_2$ на 0,1 мл эритроцитов плазмы 30 минут	Количество исследованных	51	31	49	29
	среднее	288,7	252,6	165,4	165,4
	среднее квадратное отклонение	42,4	57,9	23,7	22,6

При помощи этой методики обнаружена разница между активностью холинэстеразы эритроцитов населения Силезии и нормой для населения Швеции, приведенной в таблице (62).

Колориметрическое определение активности холинэстеразы сыворотки (Molander и сотрудники) (78). Методика является модификацией рН-метрического определения активности холинэстеразы, введенной Michel (77), причем вместо рН-метра пользуются колориметром. Методика заключается в колориметрическом измерении колебаний рН, происходящих в реагирующей смеси под влиянием освобождающейся при ферментной реакции уксусной кислоты.

Реактивы:

1) вероналовый буфер с рН 8,4; смешивают 82,3 мл раствора натриевой соли вероната (растворяют 10,3 г медиала в 500 мл воды) с 17,7 мл 0,1 N HCl.

2) индикатор: растворяют 50 мг феноловой красной в 10 мл 0,1 N NaOH и доводят до 200 мл дистиллированной водой;

3) раствор субстрата: растворяют 3,5 г хлористого ацетилхолина в 100 мл дистиллированной воды.

Ход исследования: составляют стандартную кривую зависимости рН от экстинкции при 535 м μ . Для этого в ряд пробирок отмеривают по 2,0 мл вероналового буфера рН от 7,0 до 8,6, прибавляют 8,0 мл дистиллированной воды и 0,15 индикатора и результат определяют при 535 м μ . При рН от 7,2 до 8,5 зависимость является прямопропорциональной.

В три пробирки отмеривают по 2 мл вероналового буфера и помещают в водяную баню при температуре 37°. В первой пробирке начинают ферментную реакцию прибавлением 1 мл раствора ацетилхолина и 0,1 мл сыворотки. В оставшиеся две пробирки отмеривают по 1 мл воды и 0,1 мл сыворотки. Все пробирки инкубируют в течение 2 часов. По истечении этого времени во все пробирки прибавляют по 7 мл дистиллированной воды, а затем в первые две пробирки 0,15 мл феноловой красной. Первую и вторую пробу определяют колориметрически при 535 м μ по отношению к третьей пробирке как слепой, и сравнивают со стандартной кривой. Изменение рН выражается разницей исходного рН во второй пробирке и конечного рН в первой пробирке.

По данным авторов параллельные пробы при этой методике отличались не больше, чем на 0,03 рН. При методике Michel получаются в среднем на 16% более высокие результаты. У здоровых людей нормальные величины равнялись $0,66 \Delta\text{pH} \pm 0,22$.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ЛИПАЗЫ

Определение активности панкреатической липазы в сыворотке по способу Cherry и Crandall (22). Принцип методики заключается в инкубации эмульсии оливкового масла с сывороткой, с последующим титрованием освободившихся жирных кислот щелочью.

Ход исследования: 50% масляную эмульсию приготавливают эмульгированием в воде оливкового масла, не содержащего свободных жирных кислот, с прибавлением 5% гуммиарабика. Для консервации прибавляют 0,2% бензоата натрия.

2 мл этой эмульсии отмеривают в колбочку Эрленмейера, прибавляют 3 мл воды, 1 мл сыворотки и 0,5 мл нормального фосфатного буфера с pH 7,0. Тщательно смешивают и инкубируют в термостате в течение 24 часов при температуре 40°. По истечении этого времени прибавляют 3,0 мл 95% этанола и освободившиеся жирные кислоты титруют раствором N/20 NaOH, после прибавления 3 капель 1% раствора фенолфталеина в этаноле.

Показателем активности фермента является разница количества NaOH, потраченного на титрование опытной и контрольной пробы. В качестве контрольной пробы пользуются такой же смесью, как приведено выше, с той только разницей, что сыворотку предварительно инактивируют нагреванием.

Определение активности панкреатической липазы в сыворотке способом Tietz и сотрудники (108). Методика является модификацией способа Cherry и Crandall.

Реактивы:

1) эмульсия оливкового масла: 93 мл H_2O , 0,2 г бензоата натрия и 7 г гуммиарабика смешивают в гомогенизаторе на малых оборотах до полного растворения. Затем, помешивая, прибавляют 93 мл оливкового масла и после помешивания в течение трех минут гомогенизируют в течение 5 минут на высоких оборотах. Эмульсия устойчива в течение 6 месяцев при хранении в температуре 10—14°. Перед употреблением ее следует встряхивать.

2) N/20 NaOH;

3) 1% раствор тимолфталеина в этаноле;

4) вероналовый буфер с pH 8,0. 0,8583 г натриевой соли вероната (мединал) и 0,4183 г вероналовой кислоты растворяют в 90 мл горячей воды. После охлаждения доводят объем водой до 100 мл, проверяют pH и для консервации прибавляют 2—3 капли толуола или хлороформа. Хранят в холодильнике;

5) 95% этанол.

Ход исследования: в каждую из двух пробирок отмеривают 2,5 мл воды, 3 мл эмульсии оливкового масла и 1 мл буфера с pH 8,0. В одной из пробирок начинают реакцию, прибавляя 1 мл сыворотки. Вторая пробирка служит в качестве контрольной. 1,0 мл сыворотки отмеривают в колбу Эрленмейера и ставят в холодильник. Обе пробирки инкубируют в течение 6 часов при температуре 37°. Содержимое опытной пробы переносят в чистую колбу Эрленмейера, а содержимое контрольной — в колбу с сывороткой, которая хранилась в холодильнике. В обе колбы прибавляют 3 мл этанола и титруют щелочью в присутствии 4 капель индикатора до светлоголубого цвета. Показателем активности липазы в единицах является разница количества щелочи, потраченной на титрование опытной и контрольной пробы. У 100 здоровых лиц количество щелочи не превышало 1 мл, а активность липазы в среднем равнялась 0,41 единицы у мужчин и 0,45 у женщин.

Применение таких масляных эмульсий, как в двух приведенных выше способах, имеет ряд технических неудобств. Трудным является точное титрование мутного раствора, а конечный пункт титрования является неотчетливым. Результаты не пропорциональны количеству фермента и вероятно в значительной степени зависят от физических свойств взятой для исследования эмульсии (37). Ввиду этого Gomi рекомендует применение хромогенных субстратов как для определения липазы, так и для определения неспецифической холинэстеразы сыворотки. Такие субстраты можно получить, смешивая с α - и β -нафтолом жирные кислоты, имеющие цепь различной длины.

Приготовление таких эфиров описано Nachlas и Seligman (84, 85). По мнению Gomi (37) псевдохолинэстераза с большой скоростью гидролизует

нафтоловые эфиры с короткой цепью. Применяя в качестве субстрата бутировый эфир α -нафтола они получают очень хорошие результаты при разведении сыворотки 1:1000 или 1:2000 после часовой инкубации, причем 10^{-5} М эзеринном.

Обнаружить панкреатическую липазу в сыворотке при таком разведении не удастся. Хэ значительно медленнее разлагает нафтоловые эфиры с длинной цепью. При использовании в качестве субстрата α -нафтиллаурината (C_{12}), разведение сыворотки в отношении 1:5 требует инкубации смеси в течение 4—5 часов для получения результатов, приближенных к тем, которые дает разведение 1:2000 с эфиром кислоты, содержащей 4 атома углерода в молекуле. Нафтоловые эфиры жирных кислот с длинной цепью очень медленно расщепляются эстеразой сыворотки и хорошо расщепляются липазой. Поэтому они пригодны для определения активности панкреатической липазы сыворотки, особенно, если прибавить эзерин для полной инактивации эстеразы, или таурохолат, который инактивирует эстеразу и активирует липазу.

Колориметрическое определение липазы и эстеразы в сыворотке по Seligman и Nachlas (102). Субстратом в этой методике является β -нафтиллауринат (C_{12}). Освободившийся во время ферментной реакции β -нафтол в сочетании с тетразонатом орто-дианизидина превращается в диазокраситель. Этот краситель экстрагируют этилацетатом и определяют колориметрически. Субстрат гидролизуется как липазой, так и эстеразой.

Реактивы:

- 1) β -нафтиллауринат хранят в виде запасного раствора, содержащего 200 мг препарата на 100 мл ацетона;
- 2) тетразонат орто-дианизидина;
- 3) таурохолат натрия 8×10^{-2} М 890 мг в 100 мл воды. Стоек в течение 1 месяца если хранить его при температуре 4° ;
- 4) 0,1 М вероналовый буфер pH 7,4. Смешивают 58 мл раствора, содержащего 10,3 г медиала в 500 мл H_2O с 72 мл 0,1 Н HCl. Стоек в течение 1 месяца при хранении при температуре 4° ;
- 5) 40% трихлоруксусная кислота;
- 6) этилацетат.

Ход исследования: в 4 пробирки вносят по 0,2 мл сыворотки. Две из них должны содержать по 1 мл воды, а две по 1 мл таурохолата. Пятая, контрольная пробирка, содержит 2 мл H_2O . Приготавливают субстрат, прибавляя 5 мл запасного раствора субстрата к 10 мл вероналового буфера и 35 мл воды, при помощи погруженной пипетки. Образуется мутная коллоидальная смесь, содержащая 0,2 мл субстрата в 1 мл. 5 мл этой смеси вносят в каждую из 5 пробирок и инкубируют в течение 5 часов в водяной бане при температуре $37,5^\circ$. По истечении этого времени в каждую пробирку прибавляют 1 мл раствора тетразоната орто-дианизидина, приготовленного непосредственно перед употреблением путем растворения 40 мг соли в 10 мл воды. Через две минуты прибавляют 1 мл 40% трихлоруксусной кислоты и затем экстрагируют красный краситель при помощи 10 мл этилацетата. Пробу центрифугируют в течение 5 минут; 5 мл органического слоя отмеривают в сосудик колориметра и колориметрируют при 540 м μ по отношению к слепой пробе. В нормальной сыворотке Е, полученная в пробирках без таурохолата, всегда была более высокой, чем в пробирках с таурохолатом, который инактивирует эстеразу сыворотки. Активность, полученная в пробирках без таурохолата, является показателем активности неспецифической эстеразы сыворотки. Если в сыворотке имеется липаза, результаты в пробирках с таурохолатом являются более высокими, чем без этого препарата, так как в этих случаях происходит активирование липазы таурохолатом. Активность липазы выражается разницей активности в пробирках. Количество освободившегося β -нафтола рассчитывают по полученным результатам при помощи стандартной кривой, составленной на растворах β -нафтола разной концентрации, подвергнутых описанным выше манипуляциям. За одну единицу липазы авторы принимают то количество фермента, которое в присутствии таурохолата вызывает освобождение 0,01 мг β -нафтола сверх количества, освободившегося под воздействием неспецифической эстеразы сыворотки, в течение 5-часовой инкубации при температуре $37,5^\circ$.

У 50 здоровых лиц активность эстеразы колебалась от 0,03 до 0,1 мг нафталина, освобожденного 0,2 мл сыворотки в приведенных условиях. Инактивация, зависящая от действия таурохолата, равнялась 6—38%. В нормальной сыворотке этим способом не обнаруживается активности липазы. У больных с заболеваниями поджелудочной железы в сыворотке появляется активная липаза.

Для определения активности липазы в моче Nachlas и Blackburn описали сходную методику, пользуясь эфиром динафтола с каприлевой кислотой (86). Для определения липазы в содержимом 12-перстной кишки имеется сходный способ, при котором в качестве субстрата пользуются эфиром динафтола с олеиновой кислотой (100).

Определение активности липопротеиновой липазы. Вначале, для определения активности липопротеиновой липазы, пользовались измерением просветления, наступающего под воздействием на субстрат (липемическую плазму, искусственную жировую эмульсию или сметану) исследуемой гепаринизированной плазмы (4, 7, 23, 39, 117). Эти методы, при которых производится определение вторичных физических явлений, сопутствующих ферментативной реакции, не отображают точного течения реакции. Поэтому правильным было введение методов, в которых показателем активности является количество продуктов, образовавшихся при реакции липолиза, то есть количество глицерина или жирной кислоты.

Определение количества липопротеиновой липазы путем титрования (Łukasik, Orłowski) (71, 72). Плазму или кровь инкубируют с приготовленной соответствующим образом эмульсией оливкового масла. Показателем активности фермента является количество освободившихся свободных жирных кислот, определенное методикой Dole (28).

Реактивы:

1) субстрат: 96 мл М/15 фосфатного буфера с рН 7,5, 4,0 мл оливкового масла и 300 мг лецитина эмульгируют в гомогенизаторе в течение 2,5 минут. Перед употреблением эмульсии для ферментативной реакции, в отмеренном количестве эмульсии растворяют сухую плазму до конечной концентрации 3,5% и гепарин в количестве 1 единица на миллилитр.

2) реактив для определения свободных жирных кислот по Dole (28).
Ход исследования: после внутривенного введения гепарина (обычно в дозе 1 мг/кг веса тела), через определенный промежуток времени (лучше всего 15—30 минут) берут кровь из вены локтевого сгиба и центрифугируют для отделения плазмы. В пробирку с пришлифованной стеклянной пробкой отмеривают 0,8 мл субстрата и помещают в водяную баню при температуре 37°C. Через несколько минут, необходимых для выравнивания температуры, прибавляют 0,2 мл подогретой до той же температуры активной исследуемой плазмы, смешивают и инкубируют в течение 30 минут. После этого прерывают реакцию, прибавляя 5 мл экстракционной смеси (изопропиловый спирт 40 частей — гептан 10 частей, 1N H₂SO₄ 1 часть). Содержимое пробирки тщательно встряхивают, а затем прибавляют 3 мл гептана и 3 мл дистиллированной воды. После повторного тщательного встряхивания набирают пипеткой 3 мл гептана, находящегося в верхнем слое жидкости, переносят в центрифужную пробирку, прибавляют 1 мл индикатора (0,01% раствор нильской синей в 90% этаноле) и титруют свободные жирные кислоты при помощи 0,018 N раствора NaOH. Для титрования лучше всего пользоваться микробюреткой, которую можно самим сделать из стеклянного туберкулинового шприца, поршень которого продвигают при помощи микрометрического винта. Микробюретку следует предварительно откалибровать на ход микрометрического винта при помощи известных стандартных растворов олеиновой кислоты, определенных таким же образом. Во время титрования смесь постоянно перемешивают при помощи струи азота, свободного от CO₂ (газ пропускают через мокрый газоочиститель с едким натром). Прирост жирных кислот в инкубированной пробе рассчитывают по разнице в титровании опытной и слепой пробы. Слепую пробу приготавливают, как и опытную, с той только разницей, что реакцию в слепой пробе прерывают при помощи экстракционной смеси еще перед началом инкубации. Результат регистрируют на собственный гидролиз субстрата в течение 30 минут при температуре 37°. Израсходованное количество едкого натра следует умножить на 4/3 для пересчета на количество жирных кислот, оставшихся в пробирке в 1 мл гептана. Показателем активности фермента является количество освобож-

денных μ молей жирных кислот 1 миллилитром плазмы в течение 1 часа в описанных условиях, обозначенное как единицы.

Согласно описанной выше методике можно произвести анализ крови, взятой из мякоти пальца, после введения больному гепарина. 0,2 мл крови из пальца смешивают с 0,8 мл подогретого субстрата и инкубируют в течение 1 часа при температуре 37°C. Параллельно ставят слепую пробу (как выше). Активность фермента рассчитывают на объем плазмы, так как эритроциты не обладают ферментной активностью. Для этого необходимо определить показатель гематокрита исследуемой крови. Дальнейшее исследование, как описано выше.

Активность фермента в единицах рассчитывают по формуле:

$$\text{активность} = \text{количество } \mu\text{молей свободных жирных кислот} \times 10 \times \frac{50}{100 - \text{гематокрит}}$$

В среднем активность плазмы, взятой через 15 минут после внутривенного введения гепарина в дозе 1 мг/кг, определенная приведенной методикой, у 42 здоровых людей равнялась 10,1 единицам.

Определение активности фосфолипазы А в сыворотке по Zieve и Vogel (118). Методика заключается в определении количества освободившихся жирных кислот способом Dole (28) после инкубации сыворотки с субстратом, содержащим лецитин.

Реактивы:

- 1) 0,1 М раствор глицина в 0,05 М боратном буфере с pH 8,45;
- 2) раствор субстрата, содержащий 25 мг лецитина (31,1 μ молей) и 20 мг (48,2 μ молей) дезоксихолата натрия в 4 мл глициново-боратного буфера;
- 3) реактивы для определения свободных жирных кислот по Dole (28).

Ход исследования: сыворотку и субстрат подогревают отдельно при температуре 55° в течение 30 минут. Затем смешивают 1 мл сыворотки с 1 мл субстрата и инкубируют в течение 18 часов при температуре 55°C. По истечении этого времени определяют прирост свободных жирных кислот методикой Dole по отношению к слепой пробе, не содержащей сыворотки.

Определение активности фермента в содержимом двенадцатиперстной кишки производят с 1 мл содержимого, разведенного в отношении 1:25. Время инкубации равно 1 часу. За единицу активности авторы принимают то количество фермента, которое в указанных условиях вызывает освобождение 0,0001 μ моля жирных кислот из лецитина 1 мл дуоденального содержимого $\times 10^4$ (для избежания дробей) в течение 1 минуты.

Подогревание сыворотки перед началом анализа до 55° и pH 8,45 исключают возможность освобождения жирных кислот липазой сыворотки из жиров. Это исключает также возможность действия фосфатазы В. В фосфатном буфере и pH 7,0 активность фермента была минимальной.

У 18 здоровых людей активность сыворотки колебалась от 4 до 16 единиц в 1 мл, в среднем — 10 единиц. Только у больных с острым панкреатитом отмечалось резкое увеличение активности фермента, достигающее иногда до 200 единиц. Нормальная активность имеет место при большой группе других терапевтических заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alles G. A., Hawes R. C.: J. Biol. Chem. 1940, 133, 375. — 2. Ammon R.: Pflug. Arch. Physiol. 1934, 233, 486. — 3. Ammon R., Voss G.: Pflug. Arch. Physiol. 1935, 235, 393. — 4. Anderson M. G., Fawcett B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 74, 768. — 5. Anfinsen C. B., Boyle E., Brown R. K.: Science 1952, 115, 583. — 6. Anfinsen C. B.: Fat Metabolism. Edit. Najjar V. A. The John Hopkins Press. Baltimore 1954, 93. — 7. Angervall G., Hood B.: Acta med. scand. 1957, 157, 407. — 8. Antopol W., Tuchman L., Schiffrin A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1938, 38, 363. — 9. Augustinsson K. B., Nachmansohn D.: Science 1949, 110, 98. — 10. Augustinsson K. B., Heimbürger G.: Acta Physiol. Scand. 1953, 30, 45. — 11. Augustinsson K. B.: Acta Physiol. Scand. 1955, 35, 40. — 12. Augustinsson K. B.: Acta Chem. Scand. 1959, 13, 571, 1081, 1097. — 13. Austin L., Berry W. K.: Biochem J. 1953, 54, 695. — 14. Balls A. K., Matlack M. B., Tucker I. W.: J. Biol. Chem. 1937, 122, 125. — 15. Bergmann F., Wilson I. B., Nachmansohn D.: J. Biol. Chem. 1950, 186, 781. — 16. Benstz W.: Klin.

- Wschrft. 1956, 34, 796. — 17. Bernheim F., Bernheim L. C.: J. Pharmacol. Exp. Therap. 1938, 64, 209. — 18. Bernheim F., Bernheim L. C.: J. Pharmacol. Exp. Therap. 1941, 71, 164, 1943, 75, 328. — 19. Block W. J. и соавт.: Circulation 1951, 4, 674. — 20. Brucke F. Th., Hueber E., Sarrander H.: Klin. Wschrft. 1941, 19, 587.
21. Castro Mendosa H., Jimenez Diaz C.: Bull. Inst. Med. Res. Univ. Madrid. 1949, 2, 81. — 22. Cherry I. S., Crandall L. A. Jr.: Am. J. Physiol. 1932, 100, 266. — 23. Ciswicka M., Sznajderman M.: Pol. Tyg. Lek.: 1956, 11, 2145, 1958, 13, 86. — 24. Connor W. E., Eckstein J. W.: J. Clin. Invest. 1959, 38, 1746. — 25. Czyżyk A.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1953, 23, 621, 1954, 24, 305. — 26. Czyżyk A., Karczewska H.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1954, 24, 745. — 27. Dixon G. H., Neurath H., Pechere J. F.: Ann. Rev. Biochem. 1958, 27, 489. — 28. Dole V. P.: J. Clin. Invest. 1956, 35, 150. — 29. Dubois K. P., Mangun G. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1947, 64, 137. — 30. Engelberg H.: J. Biol. Chem. 1956, 222, 601.
31. Faber M.: Acta Med. Scand. 1943, 114, 72. — 32. Funke A., Bagst J., Depierre F.: Compt. rend. acad. Sci. 1954, 239, 329, 370. — 33. Gerebtzoff M. A.: C. R. Soc. Biol. 1954, 148, 397. — 34. Glick D., Glaubach S.: J. Gen. Physiol. 1941/42, 25, 179, 197. — 35. Goldner M. G., Morse M.: J. Lab. Clin. Med. 1949, 34, 858. — 36. Gomori G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1945, 58, 362. — 37. Gomori G.: Am. J. Clin. Path. 1957, 27, 170. — 38. Gronchi V.: Sperimentale 1936, 90, 223, 262. — 39. Grossman M. J.: J. Lab. Clin. Med. 1954, 43, 445. — 40. Grossman M. J., Stadler J., Cushing A., Palm L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955, 88, 132.
41. Grott J. W., Stachurska-Torzecka W.: Pol. Tyg. Lek. 1955, 10, 1137. — 42. Grott J. W., Stachurska-Torzecka W.: Pol. Tyg. Lek. 1955, 10, 1169. — 43. Hahn P. F.: Science 1943, 98, 19. — 44. Havel R. J., Boyle E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1954, 85, 468. — 45. Hawkins R. D., Mendel B.: Biochem. J. 1949, 44, 260. — 46. Hoare R., Tuba J., Lab. Clin. Med. 1951, 38, 613. — 47. Hollet C., Meng H. C.: Biochim. Bioph. Acta 1956, 20, 421. — 48. Hollet C., Meng H. C.: Am. J. Physiol. 1956, 184, 428. — 49. — Jansz H. S., Posthumus C. H., Cohen J. A.: Biochim. Bioph. Acta 1959, 33, 387, 396. — 50. Kalow W., Genest K.: Can. J. Biochem. and Physiol. 1957, 35, 339.
51. Kaufmann K.: Ann. Int. Med. 1954, 41, 533. — 52. Kesser R.: Klin. Wschrft. 1938, 16, 1811. — 53. Kisch B., Koster H., Strauss E.: Exp. Med. Surg. 1943, 1, 51. — 54. Kisielewski T., Łyszczyk J.: Post. Biochem. 1959, 5, 47. — 55. Kopeć M.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1957, 27, 1197. — 56. Korn E. D., Quigley T. W.: J. Biol. Chem. 1937, 226, 833. — 57. Korn E. D.: Science 1954, 120, 399. — 58. Korn E. D.: J. Biol. Chem. 1955, 215, 1. — 59. Korn E. D.: J. Biol. Chem. 1957, 226, 327. — 60. Koshland D. E. Jr., Erwin M. J.: J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 2657.
61. Kowarzyk H.: Badania nad właściwościami, pochodzeniem i znaczeniem fizjologicznym cholinesterazy krwi; Kraków, 1939. — 62. Krause M., Lewicka A.: Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 206. — 63. Kunkel H. G., Ward S. M.: J. Exp. Med. 1947, 86, 325. — 64. Lawler H. C.: Feder. Proc. 1960, 19, 337. — 65. Lehman H. и соавт.: Proc. Soc. Med. 1957, 50, 147. — 66. Levy S. W., Swank R. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953, 82, 553. — 67. Lewy S. W., Swank R. L.: J. Physiol. 1955, 127, 297. — 68. Lisowski J., Drzeniek R., Kaluża J.: Arch. Imm. Ter. Dośw. 1958, 6, 333. — 69. Loewi O., Navratil E.: Pflug. Arch. Physiol. 1926, 214, 678. — 70. Łukasik S.: Lipaza lipoproteinowa. Wrocławskie Tow. Naukowe.
71. Łukasik S., Orłowski M.: Pol. Tyg. Lek. 1958, 13, 1643. — 72. Łukasik S., Orłowski M.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1960, 30, 975. — 73. Marchis-Mouren G., Sarda L., Desnuelle P.: Arch. Bioch. Bioph. 1959, 83, 309. — 74. McCombie H., Saunders B. C.: Nature, 1946, 157, 287; 776. — 75. Mendel B. B., Rudney H.: Biochem. J. 1943, 37, 59. — 76. Mendel B. B., Hawkins R. D.: Estimation of Cholinesterases. Methods in Medical Research. Vol. 3. The Year Book Publishers INC. 1950. — 77. Michel H. D.: J. Lab. Clin. Med. 1949, 34, 1564. — 78. Molander D. W., Friedrich H. M., Batson H. M.: Am. J. Med. Sc. 1957, 234, 538. — 79. Moore C. B., Birchall R., Huggins C.: Cancer Res. 1949, 9, 547.
81. Myers D. K.: Biochem. J. 1953, 55, 67. — 82. Myers D. K., Schotte A., Boer H., Borsje-Bakker H.: Biochem. J. 1955, 61, 521. — 83. Myers D. K., Schotte A., Mendel B.: Biochem. J. 1955, 60, 481. — 84. Nachlas M. M., Seligman A. M.: J. Biol. Chem. 1949, 181, 343. — 85. Nachlas M. M., Seligman A. M.: J. Nat. Cancer Inst. 1945, 9, 415. — 86. Nachlas M. M., Blackburn R.: J. Biol. Chem. 1958, 230, 1051. — 87. Nathman M. M., Pratt J. H., Callow A. D.: Arch. Int. Med. 1955, 95, 224. — 88. Nathman M. M., Pratt J. H., Callow A. D. Ibid. 1957, 100, 221. — 89. Nikkila E. A., Pesola R.: Acta Chem. Scand. 1956, 10, 144. — 90. Oka M.: Acta Med. Scand. 1954, 150, 313.
91. Orłowski M.: Pol. Tyg. Lek. 1958, 13, 588. — 92. Orłowski M., Kotlarek-Haus S.: Pol. Tyg. Lek. 1958, 13, 707. — 93. Osterbaan R. A., Kunst P., van Rotterdam J., Cohen J. A.: Biochim. Bioph. Acta 1958, 27, 556. — 94. Pascaud M.: Comp. rend. Acad. Sci. 1955, 241, 227. — 95. Plattner F.: Pflug. Arch. Physiol. 1926, 214, 112. — 96. Ravin H. A., Tsou K. C., Seligman A. M.: J. Biol. Chem. 1951, 191, 843. — 97. Rupert F., Welz U.: Aertztl. Labor. 1957, 3, 177. — 98. Schaffner W. K., May S. C., Summerson W. H.: J. Biol. Chem. 1954, 206, 201. — 99. Shoenheimer R., Sperry W. M.: J. Biol. Chem. 1934, 106, 745. — 100. Schon H., Rassler B., Hennin N.: Klin. Wschrft. 1961, 39, 217.

101. Schonheyder F., Volquartz K.: Biochim. Bioph. Acta 1954, 15, 288. — 102. Seligman A. M., Nachlas M. M.: J. Clin. Invest. 1950, 29, 31. — 103. Shore B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1955, 90, 415. — 104. Sperry W. M.: J. Biol. Chem. 1935, 111, 567. — 105. Stedman E., Stedman E., Eason L. H.: Biochem. J. 1932, 26, 2056. — 106. Supniewski J.: Post. Hig. Med. Dośw. 1953, 6, 80. — 107. Szczeklik E., Łukasik S., Orłowski M.: Pol. Tyg. Lek. 1959, 14, 297. — 108. Tietz N. W., Borden T., Stepleton J. D.: Am. J. Clin. Path. 1959, 31, 148. — 109. Todrich A.: Brit. J. Pharmacol. 1954, 9, 76. — 110. Turner K. B., McCormack G. H., Jr., Richards A.: J. Clin. Invest. 1953, 32, 801.

111. Vogel W. C., Zieve L.: J. Clin. Invest. 1960, 39, 1295. — 112. Vorhaus L. J., Kark R. M.: Am. J. Med. 1953, 14, 707. — 113. Wills E. D.: Biochem. J. 1955, 60, 529. — 114. Wilson I. B.: The Mechanism of Enzyme Action. McElroy W. D. a. Glass B. Editors, 642. John Hopkins Press. Baltimore 1954. — 115. Wilson I. B., Bergman F.: J. Biol. Chem. 1950, 185, 479, 683. — 116. Wilson I. B.: J. Biol. Chem. 1952, 197, 215. — 117. Zemplyni T. и соавт.: Cas. Lek. Ceskich 1955, 94, 262. — 118. Zieve L., Vogel W. C.: J. Lab. Clin. Med. 1961, 57, 586.

ФЕРМЕНТЫ ОБМЕНА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

MARIAN ORŁOWSKI

РИБОНУКЛЕАЗА (РН-аза)

Этот фермент, вызывающий гидролиз рибонуклеиновой кислоты (РНК), выделил в кристаллическом виде из поджелудочной железы Kunitz (23). Он характеризуется очень высокой термостабильностью, не теряет своей активности даже после кипячения (18). Молекулярная масса фермента относительно невелика, примерно 14000. Молекула панкреатической рибонуклеазы состоит из 124 аминокислотных остатков, строение и последовательность которых в настоящее время полностью выяснены благодаря работам двух групп исследователей из США (15, 35). В молекуле фермента имеется 4 дисульфидных мостика. Оптимум pH примерно равен 7,0.

Исследования специфичности РН-азы показали, что фермент специфически расщепляет связи между фосфатной группой 3'-фосфор-пиримидин-нуклеозида и группой 5'-гидроксильной соседнего пиримидинового или пуринового нуклеозида (36). Конечными продуктами этой реакции являются олигонуклеотиды, имеющие связи между положением 3' пуриновых нуклеозидов и 5' других нуклеозидов. Продукты гидролиза имеют на конце пиридиновый нуклеозид с циклической фосфатной группой на атомах углерода 2' и 3', образующейся в качестве промежуточного продукта ферментной реакции (27). Более крупные олигонуклеотиды появляются в результате реакции в том случае, когда субстрат содержит значительное количество молекул пуриновых нуклеозидов, соединенных между собой. РН-аза расщепляет также синтетические фосфодиэстеры цитидин-3'-фосфата, или уридин-3'-фосфата, например с бензиловым спиртом, образуя соответствующие нуклеотиды, причем промежуточными продуктами являются циклические 2', 3'-фосфаты, подвергающиеся дальнейшему гидролизу до нуклеозид-3-фосфатов (7). Кроме реакции гидролиза рибонуклеаза катализирует также реакцию трансэтерификации, субстратом которой могут быть как нуклеотиды с циклической фосфатной группой, так и диэстеры 3'-нуклеотидов. Рибонуклеаза катализирует, например, реакцию цитидин-2', 3'-фосфата с метанолом, давая цитидин-3'-метилфосфат, или с 5'-гидроксильной группой другого нуклеотида, приводя к образованию олигонуклеотидов (13).

Рибонуклеаза имеется как в сыворотке, так и в моче человека (28, 12), откуда она и была получена в чистом виде (8, 11). РН-аза мочи вероятно не является однородным ферментом. Даже кристаллическая панкреатическая рибонуклеаза оказалась неоднородным ферментом, и при помощи различной

методики в ней удалось обнаружить наличие двух фракций, названных рибонуклеазой А и В (14, 30, 33), причем, как нам кажется, существует различие в специфичности этих двух ферментов (12). При хроматографическом разделении рибонуклеазы мочи на ионном обменнике Amberlit IRC-50 (ХЕ-64) установлено наличие двух больших и, по крайней мере, 4 малых фракций с ферментативной активностью. При таком же разделении рибонуклеазы из спермы обнаружена одна большая и две меньшие фракции. При исследовании свободной РН-азы мочи установлено, что существует два оптимума ее действия при рН 5,7 и 8,5, то есть — кислая и щелочная рибонуклеаза (11).

РН-аза мочи теряет свою активность в присутствии ионов Zn^{++} , Fe^{++} , Ag^{+} и Cu^{++} в концентрации $10^{-4} M$, как и в присутствии органических полианионов, как гиалуроновой кислоты, гепарина, сульфата хондроитина и ДНК (16). Согласно Aleksandrowicz и сотрудникам, содержание РН-азы в сыворотке у здоровых людей равно от 0,53 до 0,92 мг на 1 мл в разведении сыворотки 1:1000, а в пробах суточной мочи — колеблется от 2,77 до 22,0 мг. При хроническом миелолейкозе (гранулоцитарном) активность рибонуклеазы в моче резко увеличивается, а в сыворотке не изменяется (3, 4). Увеличение активности РН-азы в сыворотке описано при уремии (34).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ РИБОНУКЛЕАЗЫ

Имеется ряд способов определения рибонуклеазы. Разложение рибонуклеазой рибонуклеиновой кислоты сопровождается перемещением спектра поглощения субстрата в ультрафиолете в направлении коротких волн. Это перемещение наблюдается особенно отчетливо в границах 290—305 мμ. При способе Kunitz (24), основанном на этом явлении, измеряется скорость уменьшения Е при 300 мμ в смеси, содержащей субстрат, буфер и фермент. Это очень простой и быстрый способ, но он пригоден при применении очищенных препаратов РН-азы. Имеется манометрическая методика определения РН-азы, заключающаяся в измерении количества CO_2 , вытесненного из бикарбонатного буфера под влиянием кислых групп, образующихся во время гидролиза субстрата ферментом (6). Можно также определить активность фермента путем отделения РНК от продуктов его гидролиза при помощи уранилацетата, и затем определить их химическим или спектрофотометрическим способом (23,9). Для определения активности РН-азы введены также циклические нуклеотиды (11), а также использованы свойства РНК давать помутнение с подкисленными альбуминами сыворотки.

Определение активности РН-азы по Dickman и Trupin (9). Принцип: при рН 4,0 уранилацетат в разведенном $HClO_4$, прибавленный к смеси, содержащей РНК и РН-азу, осаждает рибонуклеиновую кислоту и нуклеотиды, содержащие аминную группу. В растворе остается уридино-фосфорная кислота, циклический фосфат уридина и уридиновые полинуклеотиды. Эти соединения, как продукт действия РН-азы на субстрат, можно определить спектрофотометрически.

Реактивы:

- 1) имеющийся в продаже препарат РНК очищают способом Vischer и Chargaff (39) и приготавливают 2% раствор, доводя рН до 5,0 или 7,5. Раствор стоек в замороженном состоянии;
- 2) кристаллический препарат РН-азы растворяют в 0,2 М ацетатном буфере с рН 5,0 или в буфере Tris рН 7,5, содержащем 0,2 М NaCl. Оба раствора содержат 0,001% желатина. Фермент растворяют в соответствующем буфере;
- 3) запасной раствор уксуснокислого уранила. А) для анализов при рН 5,0. 0,8% раствор уксуснокислого уранила ($UO_2Ac_2 \cdot 2H_2O$) в 0,85% $HClO_4$. В) для анализов при рН 7,5 приготавливают 0,8% раствор уксуснокислого уранила в 0,33% $HClO_4$. Перед употреблением

оба раствора разводят 5 объемами воды. (Примечание: раствор рибонуклеазы в фосфатном буфере дает с этими реактивами осадок фосфатов).

Ход исследования: 0,5 мл раствора РНК приливают к 0,4 мл соответствующего буфера, затем прибавляют 0,1 мл РН-азы и начинают инкубацию. Инкубируют в толстостенных пробирках в течение 10 минут при температуре 37°C. Реакцию прерывают, прибавляя 3 мл соответствующего раствора уксуснокислого уранила. Содержимое пробирок смешивают, оставляют на 15 минут и затем центрифугируют. 1 мл прозрачной жидкости над осадком анализируют, не содержащих РН-азы или РНК. Методику стандартизируют при помощи растворов, содержащих известное количество кристаллической РН-азы. Минимальная растворимость аденозин-, цитидин- и гуанозин-3'-фосфатов отмечалась при рН 3,8—4,0.

Определение активности РН-азы по Housk (17). Методика заключается в измерении помутнения, образующегося при воздействии на РНК подкисленным раствором альбуминов. Это помутнение зависит от длины цепочки полимера РНК.

Реактивы:

- 1) РНК из дрожжей растворяют в 0,13 М NaCl, содержащем 0,02 М двузамещенного ортофосфата натрия, чтобы получить раствор, содержащий 500 μ г/мл РНК с рН 7,3;
- 2) кристаллическая панкреатическая РН-аза;
- 3) фракция V альбуминов сыворотки;
- 4) реактив, вызывающий помутнение, содержащий 0,3 мг/мл альбумина сыворотки в 0,1 М ацетатном буфере с рН 4,0, содержащем 1 мг желатина на 1 мл для стабилизации мут. Для получения муты к 1 мл нуклеиновой кислоты прибавляют 5 мл этого реактива и помутнение определяют в спектрофотометре Coleman при 400 м μ .

Ход исследования: 0,5 мл раствора РНК и 0,5 мл раствора РН-азы в фосфатно-солевом растворе (1), содержащем от 10 до 50 μ г панкреатической РН-азы смешивают и инкубируют в течение от 0 до 30 минут при температуре 37°C. После этого прибавляют реактив, вызывающий помутнение, что одновременно прерывает ферментативную реакцию. Определяют помутнение при 400 м μ . Количество разложенной РНК определяют из соответственным образом составленной стандартной кривой по разнице исходного помутнения, вызванного 500 μ г РНК и конечного помутнения после ферментативной реакции. По количеству деполимеризованного субстрата можно рассчитать соответствующее ему количество кристаллической РН-азы. При определении РН-азы в сыворотке или моче, их следует развести стократно.

Определение активности РН-азы по Aleksandrowicz и соотрудникам, а также Spierer (38). Для определения активности РН-азы в сыворотке и моче Aleksandrowicz и соотрудники пользовались способом, основанным на методике McCarthy (31).

Реактивы: 1N HCl. 0,1% раствор натриевой соли рибонуклеиновой кислоты из дрожжей (Merck) в 0,05 М ацетатном буфере с рН 5,6. Водный раствор чистой РН-азы (Kunitz).

Ход исследования: 1 мл субстрата инкубируют с 1 мл водного раствора фермента в течение 30 минут при температуре 37°. Прибавляют 1 мл 1 N HCl и через 5 минут определяют помутнение в фотометре Пульфриха при 470 м μ . Количество РН-азы определяют по стандартной кривой, составленной по известным количествам кристаллической РН-азы. Активность фермента в сыворотке и моче определяют в ряду разведений, взятых в геометрической прогрессии. В качестве единицы авторы принимают активность, соответствующую разведению 1 : 100 000 кристаллической РН-азы.

ДЕЗОКСИ-РИБОНУКЛЕАЗА (ДН-аза)

Этот фермент парализует гидролиз дезокси-рибонуклеиновой кислоты (ДНК). Существуют две ДН-азы: ДН-аза I и ДН-аза II. Kunitz (25) выделил ДН-азу I из поджелудочной железы в кристаллическом виде. Молекулярная масса ее примерно равна 60 000, она является термолабильной и для проявления своей активности нуждается в наличии двухвалентных ионов металлов Mg^{++} и Mn^{++} . Оптимальное действие ее проявляется при рН 7,5. Кроме этого фермента во многих тканях обнаружена еще и другая ДН-аза

с кислым оптимум рН 5,6. Эти оба фермента имеются в тканях поджелудочной железы, в панкреатическом соке имеется только ДН-аза I. В поджелудочной железе активность ДН-азы I превосходит активность ДН-азы II в 200 раз, в остальных тканях активности ДН-азы I не обнаружено. Отсюда сделан вывод, что ДН-аза I обладает функцией переваривания (5). Специфичность этих ферментов различна (27). Панкреатическая ДН-аза, действуя на ДНК, вызывает освобождение олигонуклеотидов, на конце которых имеется фосфатная группа в положении 5', так как этот фермент гидролизует связь между остатком фосфорной кислоты и С 3' дезоксирибозы. ДН-аза II из селезенки освобождает из ДНК моонуклеотиды, кончающиеся фосфатной группой в положении 3', так как она гидролизует межнуклеотидные связи между остатком фосфорной кислоты и С 5'. Оба фермента обнаружены как в моче, так и в слюворотке. В разных тканях и в железе имеется ингибитор ДН-азы I белкового характера, который инактивируется при подогревании фермента в течение 5 минут до температуры 56°, прибавлении трипсина или хранении слюворотки при комнатной температуре в течение нескольких дней. В моче обнаружен термоустойчивый ингибитор ДН-азы II, который можно удалить путем длительного диализа (22). После облучения лучами X активность обеих ДН-аз в моче увеличивается (20). Увеличение активности ДН-азы в слюворотке наблюдается при тяжелых поражениях печени и иногда при лейкозах (37). У больных с острым панкреатитом увеличивается активность ДН-азы I (21). ДН-аза I применяется с терапевтической целью. Вероятно имеется зависимость между активностью ДН-азы II тканей и способностью их к пролиферации и регенерации (5).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДЕЗОКСИ-РИБОНУКЛЕАЗЫ

Во время гидролиза растворов ДНК ДН-азой уменьшается вязкость раствора и увеличивается абсорбция раствора при 260 м μ (25). Одновременно освобождаются кислые группы, которые можно определить титрованием, однако свободная фосфорная кислота не освобождается. Продукты гидролиза ДНК не осаждаются в кислой среде. Все эти свойства используются для определения активности ДН-азы. Методика Kunitz (25) является наиболее простой для измерения активности ДН-азы в очищенных растворах фермента. Для определения активности ДН-азы использовано также явление большого сродства щелочных красителей, как метиленовая зелень, к высокополимеризованной ДНК (26). Для определения активности как очищенных так и неочищенных ферментных препаратов, а также слюворотки и мочи, чаще всего пользуются методикой, которую описали Allfrey и Mirsky (5). Она заключается в колориметрическом определении дезокси-рибонуклеотидов, растворимых в кислоте и освобождающихся при воздействии фермента на субстрат.

Определение активности ДН-азы по Allfrey и Mirsky (5).

Субстрат: 1) 200 мг высокополимеризованной натриевой соли ДНК (32, 19) растворяют в 100 мл воды или 0,05 М $MgSO_4$ при исследовании фермента, активизируемого Mg^{++} ;

Буферы: 2) 0,1 ацетатный буфер с рН 5,6 для исследования ДН-азы II и 0,2 М вероналовый или такой же буфер Tris с рН 7,5 для анализа ДН-азы I;

3) 3,0 М трихлоруксусная кислота;

4) дифениламинный реактив Dische (10). На каждые 40 мл 1% раствора дифениламина в ледяной уксусной кислоте прибавляют 1 мл концентрированной H_2SO_4 . Реактив приготавливают непосредственно перед употреблением.

Ход исследования: 1 мл субстрата, 1 мл соответствующего буфера и 1 мл слюворотки или мочи инкубируют в течение 4 часов при температуре 37° (37), а затем реакцию прерыва-

вают, прибавляя 1 мл трихлоруксусной кислоты. Слепую пробу приготавливают таким же образом, с той только разницей, что сыворотку прибавляют после трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугируют в течение 15 минут со скоростью 10000 оборотов в минуту или фильтруют. 1,5 мл фильтрата переносят в небольшие пробирки и прибавляют 3,0 мл дифениламинового реактива. Пробирки погружают в кипящую водяную баню на 20 минут, затем вынимают и через 20 минут стояния при комнатной температуре колориметрируют при 600 мμ в сравнении со слепой пробой реактивов, то есть смеси 1,5 мл воды и 3 мл дифениламинового реактива. (Дополнительную контрольную пробу производят для внесения поправки на аутолитическую нуклеазовую активность путем инкубации смеси гомогената с буфером отдельно от субстрата, а субстрат и трихлоруксусную кислоту прибавляют под конец инкубации).

По найденной экстинкции рассчитывают количество образовавшейся дезоксирибозы при помощи соответствующим образом составленной стандартной кривой.

ЛИТЕРАТУРА

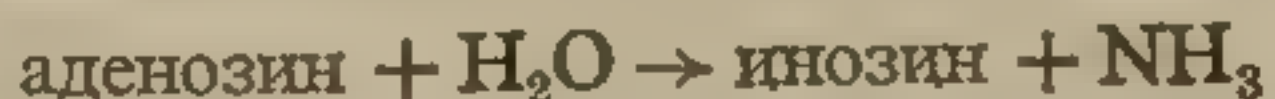
1. Aleksandrowicz J., Spierer L.: Arch. Imm. Ter. Dośw. 1954, 2, 31. — 2. Aleksandrowicz J., Spierer L.: Le Sang 1955, 26, 212. — 3. Aleksandrowicz J.: Lancet; 1958, 1, 640. — 4. Aleksandrowicz J., Urbanczyk J., Ostrowska A., Sierko J.: Blood; 1958, 13, 652. — 5. Alfrey V., Mirsky A. E.: J. Gen. Physiol. 1952, 36, 227. — 6. Bain J. A., Rush H. P.: J. Biol. Chem. 1944, 153, 659. — 7. Brown D. M., Todd A. R.: J. Chem. Soc. 1952, 2715. — 8. Dickman S. R., White L. H., Mason J. O.: Arch. Biochem. Bioph. 1958, 74, 476. — 9. Dickman S. R., Trupin K.: Arch. Biochem. Bioph. 1959, 82, 355. — 10. Dische Z.: Mikrochemie 1930, 8, 4. — 11. Hakim A. A.: Arch. Biochem. Bioph. 1959, 83, 390. — 12. Hakim A. A.: Arch. Biochem. Bioph. 1957, 70, 591. — 13. Heppel L. A. и соавт.: Biochim J. 1955, 60, 8. — 14. Hirs C. H. W., Stein W. H., Moore S.: J. Biol. Chem. 1953, 200, 493. — 15. Hirs C. H. W., Stein W. H., Moore S.: J. Biol. Chem. 1956, 221, 151. — 16. Houck J. C.: Biochim. Bioph. Acta 1957, 26, 649. — 17. Houck J. C.: Arch. Biochem. Bioph. 1958, 73, 384. — 18. Jones W., Perkins M. E.: Am. J. Physiol. 1923, 55, 547. — 19. Kay E. R. M., Simmons N. S., Dounce A. L.: J. Am. Chem. Soc. 1952, 34, 1724. — 20. Kowlessar O. D., Altman K. J., Hempelmann L. H.: Arch. Biochem. Bioph. 1954, 52, 362. — 21. Kowlessar O. D., Mc Evoy R. K.: J. Clin. Invest. 1956, 35, 1325. — 22. Kowlessar O. D., Okada S., Potter J. L., Altman K. J.: Arch. Biochem. Bioph. 1957, 68, 231. — 23. Kunitz M.: J. Gen. Physiol. 1940, 24, 15. — 24. Kunitz M.: J. Biol. Chem. 1946, 164, 563. — 25. Kunitz M.: J. Gen. Physiol. 1950, 33, 349. — 26. Kurnick N. B.: Arch. Biochem. Bioph. 1953, 43, 97. — 27. Laskowski M.: Post. Biochemii 1960, 6, 3. — 28. Laves W.: Naturwiss 1951, 38, 261. — 29. Markham R., Smith J. D.: Biochem. J. 1952, 52, 552. — 30. Martin A. J. P., Porter R. R.: Biochem. J. 1951, 49, 215. — 31. Mc Carthy M.: J. Exp. Med. 1948, 88, 181. — 32. Mirsky A. E., Pollister A. W.: J. Gen. Physiol. 1946, 30, 117. — 33. Raache I. D., Li C. H.: Biochim. Bioph. Acta 1954, 14, 290. — 34. Rabinovitch M., Liberman B., Fausto H.: J. Lab. Clin. Med. 1959, 53, 563. — 35. Redfield R. R., Anfinsen C. B.: J. Biol. Chem. 1956, 221, 385. — 36. Schmidt G., Cubiler R., Zollner N., Hecht L., Strickler N., Seraidarian K., Seraidarian M., Thannhauser S. J.: J. Biol. Chem. 1951, 192, 715. — 37. Schreier K. и соавт.: Klin. Wschrft. 1955, 33, 1096. — 38. Spierer L.: Arch. Imm. i Ter. Dośw. 1958, 6, 7. — 39. Vischer E., Chargaff E.: J. Biol. Chem. 1948, 176, 715. — 40. Zittle Ch. A., Reading E. H.: J. Biol. Chem. 1945, 160, 519.

ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ

MARIAN ORŁOWSKI

АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА (АД)

АД является ферментом, катализирующим дезаминирование аденозина, причем продуктами реакции являются инозин и аммиак



Фермент выделен из кишечника телят (24). Он отличается широким оптимумом рН с максимумом в границах рН 7,2—7,4. Фермент специфичен для аденозина и не дезаминирует аденина, аденозин-5'-фосфорной кислоты и других производных аденина. Наибольшей ферментативной активностью обла-

дает селезенка, затем тонкий кишечник, яички, надпочечники и поджелудочная железа. Печень и мышцы обладают относительно небольшой активностью. Увеличенная активность АД имеет место при гепатоме Novikoff (28). Straub, исследуя активность АД в клетках асцитического рака Эрлиха, установил относительно низкую активность фермента, зато обнаружил ферментативную активность асцитической жидкости, как и увеличение активности фермента в плазме подопытных мышей с раком, по сравнению с контрольными животными (58). Этот же автор обнаружил фермент также в сыворотке у людей, и заметил увеличение его активности больше, чем в 90% случаев у больных со злокачественными опухолями. Letnansky и сотрудники (30) подтвердили высокий процент случаев увеличенной активности АД у больных со злокачественными опухолями и особенно с бронхиальным раком, однако довольно большое количество положительных результатов имело место также у инфекционных больных. Наиболее высокая активность фермента наблюдалась при лейкозах. Schwartz и Bodansky (57) только у 8 из 55 исследованных больных обнаружили увеличение активности АД. Также исследование Kotlarek-Haus не подтвердило результатов Straub (27). Определение активности АД может иметь значение при диагностике острого лейкоза у детей; при новообразованиях же определение активности фермента не имеет диагностического значения (54).

Определение активности АД основано на измерении количества освобожденного во время реакции аммиака (55) или на наблюдении за уменьшением экстинкции при 265 мμ при переходе аденозина в инозин (24).

Определение активности аденозиндезаминазы методикой Straub (58). Методика заключается в измерении при помощи реактива Nessler количества аммиака, освобожденного во время ферментативной реакции.

Реактивы:

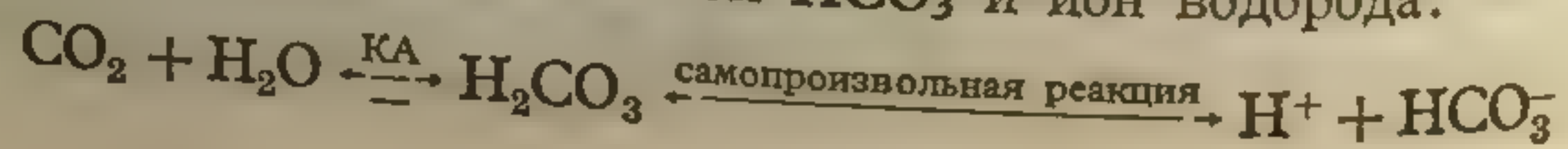
- 1) приготавливают 0,4% раствор аденозина, растворяя препарат в горячей воде;
- 2) фосфатный буфер, содержащий 7,8 г KH_2PO_4 и 17,9 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 100 мл воды;
- 3) 10% раствор трихлоруксусной кислоты;
- 4) раствор Fehlinga II, приготовленный путем растворения 5 г NaOH и 17 г тартрата натрия-калия (сегнетовой соли) в 100 мл воды;
- 5) 2% раствор гуммиарабика;
- 6) реактив Nessler: 10,0 г HgJ_2 и 8,0 г KJ растворяют в 10 мл дистиллированной воды, смешивают с 25,0 мл насыщенного раствора NaOH и прибавляют 65 мл воды. В течение нескольких дней перед употреблением хранить в герметически закрытой бутылке. Для анализа пользуются только прозрачной жидкостью над осадком.

Все реактивы растворяют в воде, лишенной CO_2 путем кипячения.

Ход исследования: в пробирке смешивают 2 мл сыворотки, 0,9 мл раствора аденозина и 0,1 мл фосфатного буфера. Из этой смеси немедленно переносят 1 мл в 2 мл трихлоруксусной кислоты в качестве слепой пробы. Остальную часть смеси инкубируют в течение 1 часа при температуре 38°. Реакцию прерывают, перенося 1 мл инкубированной смеси в 2 мл трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугируют и 1 мл прозрачной жидкости над белковым осадком переносят в чистые пробирки, прибавляют 5 мл раствора Fehling II, 1 мл раствора гуммиарабика и 2,5 мл дистиллированной воды, свободной от CO_2 . Затем прибавить 0,5 мл реактива Nessler и точно через 60 секунд сравнивают со слепой пробой при фильтре S_{48} . Активность фермента выражается в г азота аммиака, освобожденного в течение 1 часа 1 мл сыворотки в приведенных условиях.

КАРБОАНГИДРАЗА (КА)

КА является ферментом, который катализирует обратимую реакцию между окисью углерода и водой с образованием угольной кислоты, которая затем самопроизвольно диссоциирует на ион HCO_3^- и ион водорода:



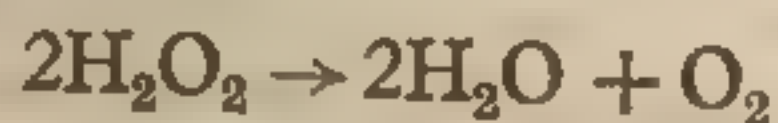
Исходным пунктом для исследований КА послужили наблюдения Henriques (21), который заметил, что освобождение CO_2 в вакууме из сыворотки происходит значительно медленнее, чем из эритроцитов, причем скорость освобождения CO_2 из сыворотки соответствовала величине, которую можно рассчитать из постоянной скорости реакции, то есть ее можно объяснить самопроизвольным распадом бикарбонатов. Ввиду того, что реакция между CO_2 и H_2O протекает относительно медленно и для завершения ее необходимо определенное время, при ее помощи невозможно объяснить газообмена, который происходит в легочных пузырьках. Пребывание эритроцитов в легких длится около секунды, поэтому реакция между свободными и связанными газами должна совершиться в этот короткий промежуток времени, а для этого она должна ускориться примерно в 300 раз (64). Вскоре был найден катализатор этой реакции, который удалось отделить от гемоглобина эритроцитов (34). Этот фермент был назван карбоангидразой (КА). В чистом виде КА получена из эритроцитов. Молекулярная масса фермента равна примерно 30000, каждая молекула белка содержит один атом цинка. В кристаллическом виде фермент выделили Scott и Фишер (56). В разведенных растворах фермент быстро теряет свою активность. Подогревание фермента при температуре $60-65^\circ$ в течение 30 минут приводит к его инактивации. Специфическими ингибиторами КА оказались сульфонамиды, что установили Mann и Keilin (31). Позже был получен ряд синтетических гетероциклических сульфонамидов, из которых наиболее известный под названием Diamox действует в 1000 раз сильнее, чем препараты, применявшиеся раньше (46).

Количество КА в эритроцитах многократно превышает количество, необходимое для катализирования происходящего в организме газообмена. Уменьшение количества фермента даже до 20% нормы не приводит к заметным расстройствам газообмена CO_2 . Фермент эритроцитов принимает участие как в удалении CO_2 из тканей, так и в удалении его в легочных альвеолах. Количество КА в эритроцитах уменьшается при анемии. При гемолитических анемиях дело доходит до поступления значительного количества фермента в плазму, а ввиду низкой молекулярной массы КА проникает через почечный фильтр и появляется в моче (47). КА обнаружена в корковом слое почек и почечных канальцах (7), где ей приписывается определенная роль в реабсорбции ионов натрия и выделении в мочу ионов водорода. Введение животным сульфонамидов приводит к уменьшению количества выделяемых с мочой кислот. Была выдвинута гипотеза, что водородные ионы в моче происходят из угольной кислоты, синтезированной при участии КА из CO_2 , образовавшейся в процессе обмена (41). При введении собаке с ацидозом диамокса — сильного ингибитора КА, в моче появлялось более 50% просочившихся бикарбонатов (3). Господствует мнение (42), что КА влияет на выделение водородных ионов с мочой и реабсорбцию ионов Na следующим образом. КА в почечных клетках катализирует образование угольной кислоты из диффундирующего с плазмой CO_2 . Последняя сразу же диссоциирует на ион водорода и HCO_3^- . Затем происходит замена водородного иона на ион натрия, находящийся в первичной клубочковой моче в просвете почечного канальца. Образовавшийся в клетке бикарбонат натрия поступает в кровяное русло, откуда может снова просочиться в клубочковую мочу. Ион водорода, который попадает в просвет канальца, реагирует с находящимися там бикарбонатами, причем образуется угольная кислота, которая разлагается на воду и CO_2 . Последняя диффундирует в почечную клетку. Весь процесс, таким образом, сводится к выделению ионов водорода и реабсорбции бикарбонатов. Косвенно процесс заключается в замене иона водорода на ион натрия. Изменения функции почек после введения диамокса можно полностью объяснить инактив-

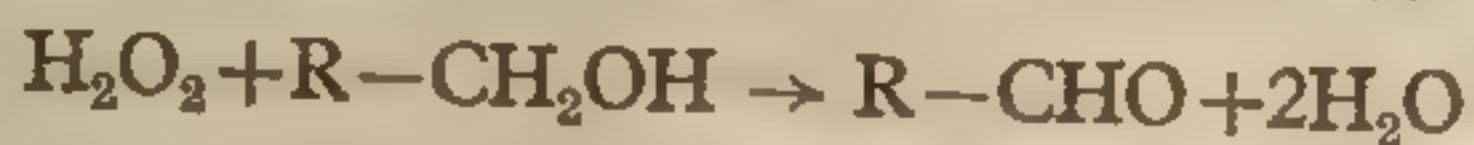
вирующим действием этого препарата на КА. Уменьшается выделение аммиака и водородных ионов, а увеличивается выделение натрия, бикарбонатов и калия. Увеличивается количество выделенной мочи, что следует объяснить как осмотический диурез, вызванный увеличением количества растворенных в моче продуктов. КА обнаружена в обкладочных клетках слизистой оболочки желудка (8) где, вероятно, играет большую роль в выделении соляной кислоты. Задача КА, вероятно, заключается в нейтрализации при помощи CO_2 щелочности, остающейся после выделения HCl слизистой оболочкой желудка. Неспецифическое инактивирующее влияние на КА оказывает ряд таких соединений, как тяжелые металлы, сульфиды, азиды, цианиды, некоторые окислительные факторы, как J_2 , KMnO_4 , соли йодной и хлорной кислот. Для определения активности КА пользуются манометрическим (35, 29), ацидометрическим (65) и колориметрическим (40) методами. Уменьшение активности КА описано при анемии, причем количество фермента по отношению к количеству эритроцитов часто бывает увеличенным (61). Увеличение количества КА отмечено при истинной полицитемии, при заболеваниях сердца с цианозом и при желтухах.

КАТАЛАЗА (КТ)

Этот фермент катализирует разложение перекиси водорода на кислород и воду согласно уравнению:



В присутствии спиртов и в небольшом количестве перекиси фермент обладает способностью переносить кислород, как и при реакции, катализируемой пероксидазой. При этом молекула спирта окисляется до альдегида (25).



Установлено, что фермент окисляет следующие спирты: метанол, этанол, *n*-пропанол, изопропанол, изобутанол, гликолы и коламин. В некоторых условиях фермент может также переносить кислород на фенолы и ароматические амины, как и пероксидаза (62). Кристаллические препараты КТ были получены еще в 1937 г (Sumner) (60), а позднее такие же кристаллические препараты были получены из различных источников. Фермент обладает сильно связанной простетической группой, которая была идентифицирована как протогематин IX (59). Молекулярный вес фермента равен примерно 240 000, а содержание железа в нем составляет 0,09%. Это значит, что в состав одной молекулы фермента входят 4 атома железа, а тем самым четыре простетические группы. Физиологическое значение каталазы заключается в защите тканей от токсического действия H_2O_2 , образующегося в процессе окисления, особенно катализируемого флавиновыми ферментами. Однако кажется более вероятным, что фермент в присутствии небольшого количества H_2O_2 , образующегося в тканях, катализирует окисление ряда субстратов, а механизм этой реакции сходен с механизмом действия пероксидазы. Каталаза является одним из наиболее активных ферментов в организме и обладает высоким числом оборотов. Большое количество фермента имеется в печени, эритроцитах, почках. Лейкоциты и лимфоциты также обладают ферментативной активностью, в сыворотке же каталаза не встречается. КТ распространена также в мире растений и бактерий, но отсутствует у анаэробных микробов. Существует большое количество ингибиторов каталазы. Уже сама перекись водорода, особенно в высоких концентрациях, приводит к инактивации фер-

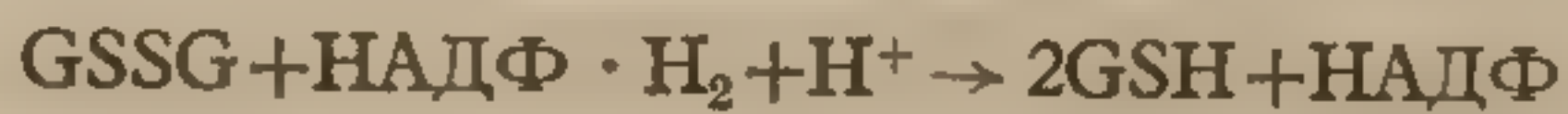
мента. Тормозящим образом действует ряд соединений, которые реагируют с трехвалентным железом простетической группы КТ, как цианиды, сульфиды, азиды, фториды, а также гидроксилламин.

Активность каталазы в эритроцитах остается неизменной при ряде заболеваний (20). Лишь при злокачественной анемии, а также и других макроцитарных анемиях отмечается увеличение каталазного индекса (активность определенного объема крови деленная на количество эритроцитов в миллионах).

При злокачественных новообразованиях отмечается уменьшение активности КТ в печени и в меньшей степени — в почках. Активность КТ в эритроцитах остается неизменной. Отмечается зависимость между величиной и скоростью роста опухоли и степенью уменьшения активности КТ в печени. Из ряда новообразований удалось изолировать фракции, которые, будучи введенными нормальным животным, вызывали у них уменьшение активности КТ в печени. Эти фракции были названы токсогормонами (37). Описано редкое заболевание, обусловленное генетически, и заключающееся в отсутствии КТ в крови и других тканях. Это заболевание носит название „*huro-catalasia*“. Оно описано в Японии. У лиц, страдающих этим заболеванием, примерно в половине случаев в детском возрасте отмечается особый вид гангрены в ротовой полости (Morbus Takahara). Это заболевание вероятно наследуется по рецессивному типу (63).

ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗА (ГР)

Этот фермент катализирует реакцию редукции окисленной формы глутатиона (GSSG) в редуцированную (GSH) при участии НАДФ · Н₂. Реакция протекает также с НАД · Н₂ в качестве кофермента, но значительно медленнее



Этот фермент широко распространен в тканях животных и обнаружен в убывающих количествах в гомогенатах из следующих органов: почек, печени, селезенки, сердечной мышцы, мозга и скелетных мышц (43). Фермент имеется также в сыворотке человека (32) и животных (33). Оптимум рН ГР сыворотки для реакции с участием НАДФ · Н₂ равен 6,5 а при участии НАД · Н₂ 6,2 (22). Гепарин сильно тормозит реакцию, особенно при участии НАД · Н₂. Увеличение активности ГР в сыворотке описано при инфекционных гепатитах, лейкозах и в большом проценте случаев у больных со злокачественными новообразованиями (32, 26). Увеличение активности фермента наблюдается также при нелеченной злокачественной анемии и при острой порфирии (22, 26).

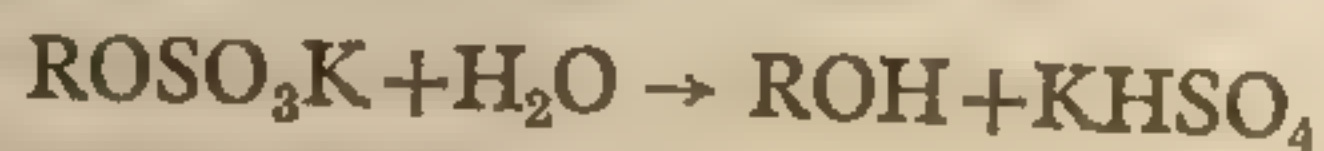
Определение активности ГР по Horn и Bruns (22). Для реакции с участием НАДФ · Н₂ следует взять: 1,6—2,4 мл фосфатного буфера по Sørensen рН 6,5; 0,2 мл раствора НАДФ · Н₂; 0,2 мл раствора GSSG и от 0,2 до 0,8 мл сыворотки. Окончательный объем смеси равен 3,0 мл. Концентрация НАДФ · Н₂ в пробе равна 0,4 мМ, а GSSG — 5×10^{-4} М. Реакция начинается при прибавлении сыворотки. Субстрат доводят до рН 6,3—6,4 при помощи NaOH. Экстинкцию определяют в сосудах с толщиной слоя 1 см при 366 мμ в сравнении со слепой пробой (с водой вместо GSSG) при температуре 25°.

Для реакции с участием НАД · Н₂ следует взять: 1,7—2,5 мл фосфатного буфера по Sørensen рН 6,2; 0,1 мл НАД · Н₂; 0,2 мл GSSG и 0,2—0,8 мл сыворотки. Окончательный объем равен 3 мл. Концентрация НАД · Н₂ 0,35 ммоля на 1 мл пробы, GSSG 5×10^{-4} М. Остальные условия, такие же, как описано выше.

Согласно материалам авторов активность у здоровых лиц в среднем равна 0,76 μ моля НАДФ \cdot H $_2$ и 0,42 μ моля НАД \cdot H $_2$ на 1 мл сыворотки в час, что соответствует тому же количеству редуцированного GSSG. Manso и Wróblewski определяли активность ГР в сыворотке с НАДФ \cdot H $_2$ при pH 7,6 (32), Kerpola и сотрудники (26) — при pH 7,4. Они приводят следующий состав смеси для реакции: 0,5 мл сыворотки; 1,5 мл фосфатного буфера pH 7,4; 0,3 мл GSSG (20 мг/мл); 0,2 мл НАДФ \cdot H $_2$ (0,2 мг) и 0,5 мл воды. Экстинкцию определяют ежеминутно в течение 15 минут при 340 м μ в толщине слоя 1 см в сравнении со слепой пробой без НАДФ \cdot H $_2$. В качестве единицы принимают изменение экстинкции при 340 м μ на 0,001 на 1 мл сыворотки в минуту. У здоровых лиц активность в среднем равна 32 ± 14 единиц.

СУЛЬФАТАЗЫ

Это ферменты, катализирующие гидролиз органических эфиров серной кислоты по общей формуле



Естественными субстратами для этих ферментов являются серные эфиры, встречающиеся в организме, как и выделяемые с мочой соединения серных эфиров, например, с фенолами и стероидами (52). Хондроитинсульфат является составной частью соединительной ткани и хряща, а мукоитинсульфат можно выделить из слизистой оболочки, стекловидного тела и пуповины. Серные эфиры желчных пигментов и трийодтиронина обнаружены в желчи (23а, 36). Синтез серных эфиров в организме не является реакцией, обратной гидролизу. Для ее течения в гомогенатах печени кроме ферментов из растворимой фракции белков необходимо наличие АТФ и ионов Mg^{++} . Этот синтез происходит в два этапа. Вначале образуется „активный сульфат“, из которого на втором этапе происходит перенесение сульфата на фенол (10). Активный сульфат идентифицирован как аденозин-3'-фосфато-5'-сульфофосфат (44, 45).

Имеется ряд различных сульфатаз, которые отличаются друг от друга специфичностью по отношению к разным эфирам серной кислоты, что является критерием для классификации этих ферментов (38):

- 1) арилсульфатазы расщепляют серные эфиры ароматических и гетероциклических фенолов;
- 2) стеридсульфатазы расщепляют серные эфиры стероидов;
- 3) гликосульфатазы расщепляют серные эфиры сахаров;
- 4) хондросульфатазы расщепляют хондроитинсульфат и мукоитиносульфат;
- 5) алкилсульфатазы гидролизуют алкилофосфаты;
- 6) аминосульфатазы или сульфамидазы принимают участие в расщеплении гепарина.

Арилсульфатазы встречаются в различных тканях млекопитающих, а прежде всего в печени. У человека ферменты этого вида обнаружены в почках, печени, мозгу, поджелудочной железе и надпочечниках (49). Арилсульфатаза (12) обнаружили в печени и в других тканях у человека три разные сульфатазы, обозначенные А, В и С. Сульфатазы А и В находятся в митохондриях (50, 51), а сульфатаза С связана с микросомами печени (13), откуда их можно получить в растворимом виде при помощи субстанций с поверхностной активностью (14, 15). Между отдельными ферментами существует разница в сродстве к разным субстратам, оптимуме pH, действии ингибиторов и так далее. Суль-

фатазы А и В обладают слабым сродством к таким простым арил-сульфатам, как фенилсульфат, п-нитрофенилсульфат, п-ацетилфенилсульфат, и быстрее разлагают 2-гидрокси-5-нитрофенилсульфат. При новообразованиях у человека отмечается низкая активность арилсульфатазы (53). При саркоме Сроскега мышечной ткани, которая считается исходной тканью этого новообразования (17). Арилсульфатаза А и В встречается в моче и сыворотке человека (1, 23, 11, 19). В моче больных раком мочевого пузыря, лейкозами, опухолями, а также при воспалительных заболеваниях мочепускающих путей уровень сульфатазы остается неизменным (4, 19).

Типичным субстратом для стеридосульфатазы является серный эфир де-гидроэпиандростерона. Этот фермент встречается в печени, где он связан с нерастворимыми фракциями клеток. Субстратом для гликоосульфатазы является глюкозо-6-серный эфир. В бактериальной флоре ротовой полости имеется фермент, разлагающий серные эфиры мукополисахаридов, находящихся в эмали зубов. В связи с этим была выдвинута гипотеза, что существует связь между хондро-сульфатазами бактерий и кариесом зубов (5, 6).

Обычным субстратом для определения активности арилсульфатазы является п-нитрофенилсульфат калия (23), определение активности заключается в измерении освобожденного в ферментной реакции п-нитрофенола после подщелачивания пробы. Для определения активности сульфатазы довольно часто пользуются также 2-гидрокси-5-нитрофенилсульфатом калия, то есть нитрокатехолсульфатом (48, 50, 18). Довольно часто пользуются также п-ацетилфенилсульфатом (13). Методика определения сульфатазы в моче, с нитрокатехолсульфатом в качестве субстрата, описана в публикации Działoszyński (19).

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams J. B.: Biochim. Bioph. Acta 1959, 32, 559. — 2. Ammon R. и соавт.: Arch. Biochem. Bioph. 1957, 69, 178. — 3. Berliner R. W., Kennedy T. J., Orloff J.: Am. J. Med. 1951, 11, 274. — 4. Boyland E., Wallace D. M., Williams D. C.: Brit. J. Cancer 1955, 9, 62. — 5. Candeli A., Tronieri A.: Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 1951, 27, 651. — 6. Candeli A., Tronieri A.: Boll. Inst. Sieroterap. Milano 1951, 30, 415. — 7. Davenport H. W., Wilhelmi A. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. 1941, 48, 53. — 8. Davenport H. W.: Am. J. Physiol. 1940, 128, 725 и 1941, 133, 257. — 9. De Meio R. H.: Acta Physiol. Latinoam. 1952, 2, 251. — 10. De Meio R. H. и соавт.: J. Biol. Chem. 1952, 195, 175; 1953, 203, 257, 1955, 213, 439. — 11. Dodgson K. S., Spencer B.: Biochem. J. 1957, 65, 668. — 12. Dodgson K. S., Spencer B., Wynn C. H.: Biochem. J. 1956, 62, 500. — 13. Dodgson K. S., Spencer B., Thomas J.: Biochem. J. 1954, 56, 177. — 14. Dodgson K. S., Rose F. A., Spencer B.: Biochem. J. 1959, 66, 357. — 15. Dodgson K. S., Rose F. A., Spencer B., Thomas J.: Biochem. J. 1957, 66, 363. — 16. Dodgson K. S., Spencer B.: Biochem. J. 1953, 53, 444. — 17. Działoszyński L. M., Zawielak J.: Acta Biochim. Polon. 1955, 2, 429. — 18. Działoszyński L. M.: Acta Biochim. Polon. 1955, 2, 421. — 19. Działoszyński L. M.: Clin. Chim. Acta 1957, 2, 542. — 20. Gepner-Woźniowska M.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1957, 27, 1183. — 21. Henriques O. M.: Biochem. Z. 1928, 200, 1. — 22. Horn H. D., Bruns F. H.: Biochem. Z. 1958, 331, 58. — 23. Huggins C., Smith D. R.: J. Biol. Chem. 1947, 170, 391. — 23a. Isselbacher K. J., Mc Carthy E. A.: Biochim Bioph. Acta 1958, 29, 658. — 24. Kalckar H. M.: J. Biol. Chem. 1947, 167, 445. — 25. Keilin D., Hartree F. E.: Biochem. J. 1945, 39, 293. — 26. Kerpola W., Nikkila E. A., Pitkanen E.: Acta Med. Scand. 1959, 164, 357. — 27. Kotlarek-Haus S.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 541. — 28. De Lamirande G.: Proc. Am. Ass. Cancer. Res. 1957, 2, 22. — 29. Leiner M.: Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1937, 136. — 30. Letnansky K., Seelich: Klin. Wschrft. 1958, 36, 826. — 31. Mann T., Keilin D.: Nature 1940, 146, 164. — 32. Manso C., Wróblewski F.: J. Clin. Invest. 1958, 37, 214. — 33. Manso C., Sugiura K., Wróblewski F.: Cancer Res. 1958, 18, 682. — 34. Meldrum N. U., Roughton F. J. W.: J. Physiol. 1931, 72, 6P. — 35. Meldrum N. U., Roughton F. J.: J. Physiol. 1933, 80, 143. — 36. Michel R., Roche J., Cloesen J., Mechel D.: Inter. Congr. Biochem. Congr. Vienna 1958; Abstracts 134. — 37. Nakahara W., Fukuoka F.: Gann. 1949, 40, 45. — 38. Ney K. H.: Z. Vitamin-Hormonfermentforschung 1959, 10, 297. — 39. Pe-

- terman M. L., Hakala N. V.: J. Biol. Chem. 1942, 145, 701. — 40. Philpot F. J., Philpot J. S. L.: Biochem. J. 1936, 30, 2191.
41. Pitts R. F., Alexander R. S.: Am. J. Physiol. 1945, 144, 239. — 42. Pitts R. F.: Fed. Proc. 1948, 7, 418. — 43. Rall T. W., Lehninger A. L.: J. Biol. Chem. 1952, 194, 119. — 44. Robbins P. W., Lipmann F.: J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 2652. — 45. Robbins P. W., Lipmann F.: J. Biol. Chem. 1957, 229, 837. — 46. Roblin R. O., Clapp J. W.: J. Am. Chem. Soc. 1950, 72, 4890. — 47. Robinson O.: J. Clin. Path. 1950, 3, 142. — 48. Robinson O., Smith J. H., Williams R. T.: Biochem. J. 1951, 49; LXXIV. — 49. Rosenfeld L.: Biochem. Z. 1925 157, 434. — 50. Roy A. B.: Biochem. J. 1953, 53, 12.
51. Roy A. B.: Biochim Bioph. Acta 1954, 14, 149. — 52. Roy A. B.: Advances in Enzymology 1960, 22, 205. — 53. Rutenburg A. M., Seligman A. M.: Arch. Biochem. Bioph. 1956, 60, 198. — 54. Sass N.: Badania nad aktywnością dezaminazy adenozy w stanach fizjologicznych i patologicznych u dzieci. Кандидат. дисерт. Wrocław 1961. — 55. Schmidt G.: Z. physiol. Chem. 1928, 179, 243, 1932, 208, 185. — 56. Scott D. A., Fisher A. M.: J. Biol. Chem. 1942, 144, 371. — 57. Schwartz M. K., Bodansky O.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1959, 101, 560. — 58. Straub F. B.: Biochimia 1957, 22, 118. — 59. Stern K. G.: J. Biol. Chem. 1935, 112, 661. — 60. Sumner J. B., Dounce A. L.: J. Biol. Chem. 1937, 121, 417.
61. Szot Z.: Acta Biochim. Polon. 1955, 2, 135. — 62. Tauber H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1952, 81, 237. — 63. Takahara S. и соавт.: J. Clin. Invest. 1960, 39, 610. — 64. Van Goor H.: Enzymologia 1948, 13, 73. — 65. Wilbur K., Anderson G.: J. Biol. Chem. 1948, 176, 147.

ТРЕТЬЯ ЧАСТЬ

ПАТОФИЗИОЛОГИЯ И КЛИНИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

РОЛЬ И ЗНАЧЕНИЕ ФЕРМЕНТОЛОГИИ В КЛИНИКЕ

KORNEL GIBIŃSKI

Изучение условий действия ферментов, их распределения в тканях, изменений, которые происходят при различных патологических состояниях, а также изучение разных ферментативных дефектов выяснило многие неясные до того времени вопросы, относящиеся к патогенезу внутренних болезней. Методические трудности мешали, однако, распространению и более широкому использованию этих достижений в практике. Разработка все более совершенных аналитических методов и оснащение больничных лабораторий все более точной измерительной аппаратурой позволило широко ввести в клинику ферментологическую диагностику. Разработка способов выделения и очистки ферментов позволила использовать их для лечебных целей.

В нашем руководстве, несмотря на то, что оно скорее преследует практическую цель, мы считали необходимым посвятить достаточно места классификации и номенклатуре ферментов, а также общим сведениям об их свойствах и способах действия. Тем самым на клиническую часть останется меньше места. Мы считаем, что по мере того, как проблемы ферментологии станут более популярными среди врачей, а клинические достижения в этой области увеличатся, книга в будущем сможет приобрести еще больший практический характер.

Лечебное применение ферментов и их специфических ингибиторов значительно расширилось в течение последних лет. Однако достижения в этой области не относятся к тем факторам, которые должным образом формируют облик современной терапии. Поэтому значительно большую часть клинического раздела мы вынуждены посвятить диагностике, ввиду того, что в этой области ферментология все глубже проникает в клиническую практику, придавая ей новые формы.

В настоящее время мы находимся на очень раннем этапе развития клинической ферментологии. На наших глазах формируются диагностические показания, для больничных лабораторий разрабатываются новые, более простые аналитические методы, вводятся в практику новые ферменты и одновременно производится клиническая оценка их диагностической пригодности. Продолжаются поиски ферментов, специфических для отдельных органов и разрабатывается карта их распределения в тканях. Развитие и проникновение ферментологии в клиническую практику встречается, однако, и будет встречаться с очень существенными трудностями. К ним относится необходимость большой осторожности в интерпретации результатов, а также дороговизна аппаратуры и реактивов, что значительно повышает стоимость содержания больного в больнице.

Среди разных внутренних заболеваний наибольший триумф переживает в настоящее время ферментологическая диагностика в области кардиологии

и гастрологии, следом за которыми идет гематология. Хотя по существу все терапевтические заболевания можно назвать ферментопатиями, так как к этим механизмам сводятся все расстройства метаболизма в организме, однако в настоящее время, невозможно еще ясно предвидеть, как далеко сумеет ферментологическая диагностика и терапия проникнуть и модифицировать практическую работу клиники внутренних болезней.

ЗАБОЛЕВАНИЯ СИСТЕМЫ КРОВООБРАЩЕНИЯ

EDWARD SZCZEKLIK

БИОХИМИЯ СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЫ

НОРМАЛЬНЫЙ ОБМЕН ВЕЩЕСТВ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ

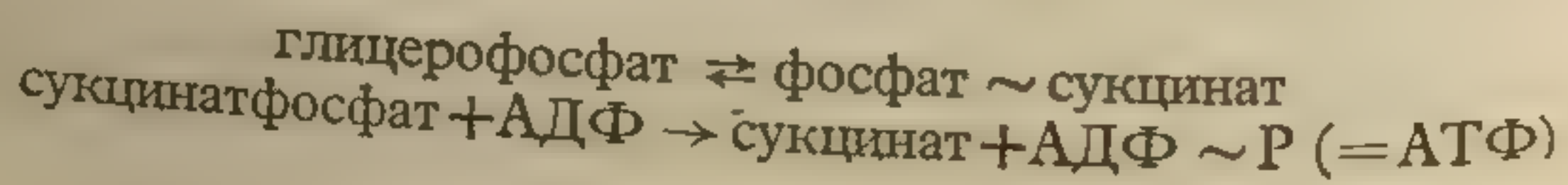
Сердечная мышца сокращается в ответ на раздражение, исходящее из проводящей системы, или из какого-нибудь импульсogenного очага, находящегося в сердечной мышце. Возбуждение, которое возникает после воздействия раздражителя, вызывает сокращение мышцы. Для сокращения мышцы используется энергия, вырабатываемая в процессе метаболизма.

Потребность в энергии покрывается за счет метаболизма сердечной мышцы в покое, который необходим для сохранения ткани. Кроме того энергия, используемая во время сокращения мышцы, покрывается за счет добавочных источников метаболизма. Мышечный метаболизм является метаболизмом кислородным, то есть дыхательным, и заключается в окислении углеводов, жиров и белков до двуокиси углерода, воды и азотных шлаков. Мышца может сокращаться также при бескислородном обмене. Наиболее существенным бескислородным обменом является гликолиз. В результате кислородного и бескислородного (гликолиза) обмена образуются высоко энергетические соединения, к которым относится креатинфосфат (КФ) и аденозинтрифосфат (АТФ). При распаде каждого из этих соединений освобождается энергия, что является непосредственной причиной сокращения сердечной мышцы.

Сократительная функция сердца зависит от его фибрилл. Это белки, главным образом миозин и актин, которые прочно связаны с аденозинтрифосфатом. Взаимодействие этих тел при участии других факторов приводит к сокращению мышцы.

Потребность в энергии, необходимой для работы сердечной мышцы, в основном покрывает дыхательный метаболизм. Но сердечная мышца может черпать энергию без кислорода, в процессе гликолиза. Раньше даже считали, что гликолиз является главным источником энергии для сокращения мышцы. Согласно теории молочной кислоты (Flechter и Hopkins 1907), первой химической реакцией, сопутствующей функции сокращения, было образование молочной кислоты, которая будто бы вызывала изменения в строении мышечных фибрилл. Однако позже было установлено, что молочная кислота не является причиной сокращения мышцы, и что источники энергии заключаются в дыхательном обмене и гликолизе.

Гликолиз является химическим процессом, при котором, благодаря разным химическим изменениям, фосфатная группа присоединяется к АДФ согласно реакции:



При реакции глицеринат → сукцинат освобождается энергия. В процессе той же реакции с соответствующими фосфорилирующими составными частями, энергия накапливается в АТФ. АТФ может принимать участие в таких реакциях, как фосфорилирование глюкозы, может также участвовать в химических реакциях, которые приводят к сокращению мышцы. Общепринято считать, что фермент АТФ-аза вызывает гидролиз АТФ, но по мнению некоторых авторов, гидролиз является только источником тепла. Во всяком случае принято считать, что АТФ доставляет энергию, необходимую для сокращения.

Большая часть свободной энергии, полученная в процессе гликолиза, находится в потенциальном состоянии в таких соединениях, как АТФ. Однако это небольшая часть энергии, которую можно получить из принесенных питательных веществ. Лишь дыхательный метаболизм (кислородный) позволяет получить большое количество высокоэнергетических фосфатов.

Для примера можно привести, что окисление одного моля глюкозы дает около 36 молей высокоэнергетических фосфатов, в сравнении с двумя молями, которые можно получить путем гликолиза. Этот сложный метаболический процесс заключается в окислении углеводов, жиров и аминокислот.

Механизм включения фосфатных групп в реакции, в которых принимают участие дыхательные ферменты, остается неясным. Во всяком случае, комплект дыхательных ферментов находится в митохондриях, которые расположены вблизи ретракционных волокон (цитировано согласно Momaerts).

Катетеризация *sinus coronarius* позволила точнее изучить обмен веществ в сердечной мышце. Сердечная мышца экстрагирует питательные вещества и кислород из крови, доставленной коронарными сосудами. Энергия, полученная при метаболизме питательных веществ, используется ретракционными белками сердечной мышцы для выполнения работы. Метаболизм сердечной мышцы можно разделить на три фазы: производство энергии, накопление энергии и использование ее.

Путем определения различных питательных веществ и кислорода в пробах артериальной крови и крови из *sinus coronarius*, а также путем измерения коронарного кровотока можно определить экстракцию этих субстанций сердечной мышцей и их расход. Можно рассчитать процент кислорода, использованного в процессе метаболизма отдельных субстратов.

Из исследований Bing и других (11) следует, что углеводы только в 35% обеспечивают сердечную мышцу субстратом. После захвата глюкозы клетками сердечной мышцы, она подвергается в них гликолитическому распаду, причем в качестве конечных продуктов образуются лактаты и пируваты. В накоплении глюкозы сердечной мышцей большую роль вероятно играет инсулин, который уменьшает проницаемость клеточной оболочки для глюкозы. При увеличении концентрации глюкозы в крови происходит усиленное ее усвоение благодаря увеличенному выделению инсулина.

Неуглеродные вещества обеспечивают 70% потребности сердечной мышцы в субстрате. Главными поставщиками энергии являются жирные кислоты, которые обеспечивают 60% потребности сердечной мышцы в субстрате. Кроме глюкозы и жирных кислот сердечная мышца экстрагирует молочную и пировиноградную кислоту, а также незначительное количество кетоновых тел и аминокислот.

Таким образом можно сказать, что энергетическую потребность сердечной мышцы покрывают главным образом жирные кислоты, глюкоза и молочная кислота. Фруктоза, несмотря на наличие в сердечной мышце фруктокиназы, лишь в незначительной степени используется сердечной мышцей.

При голодании жирные кислоты усиливают использование кислорода сердечной мышцей. У голодного человека среднее накопление свободных жирных кислот сердечной мышцей равно примерно 42% общего накопления жиров, тогда как этерифицированная фракция экстрагируется мышцей на 58% (12). Таким образом при голодании прежде всего подвергаются обмену жирные кислоты, затем углеводы и меньше всего аминокислоты.

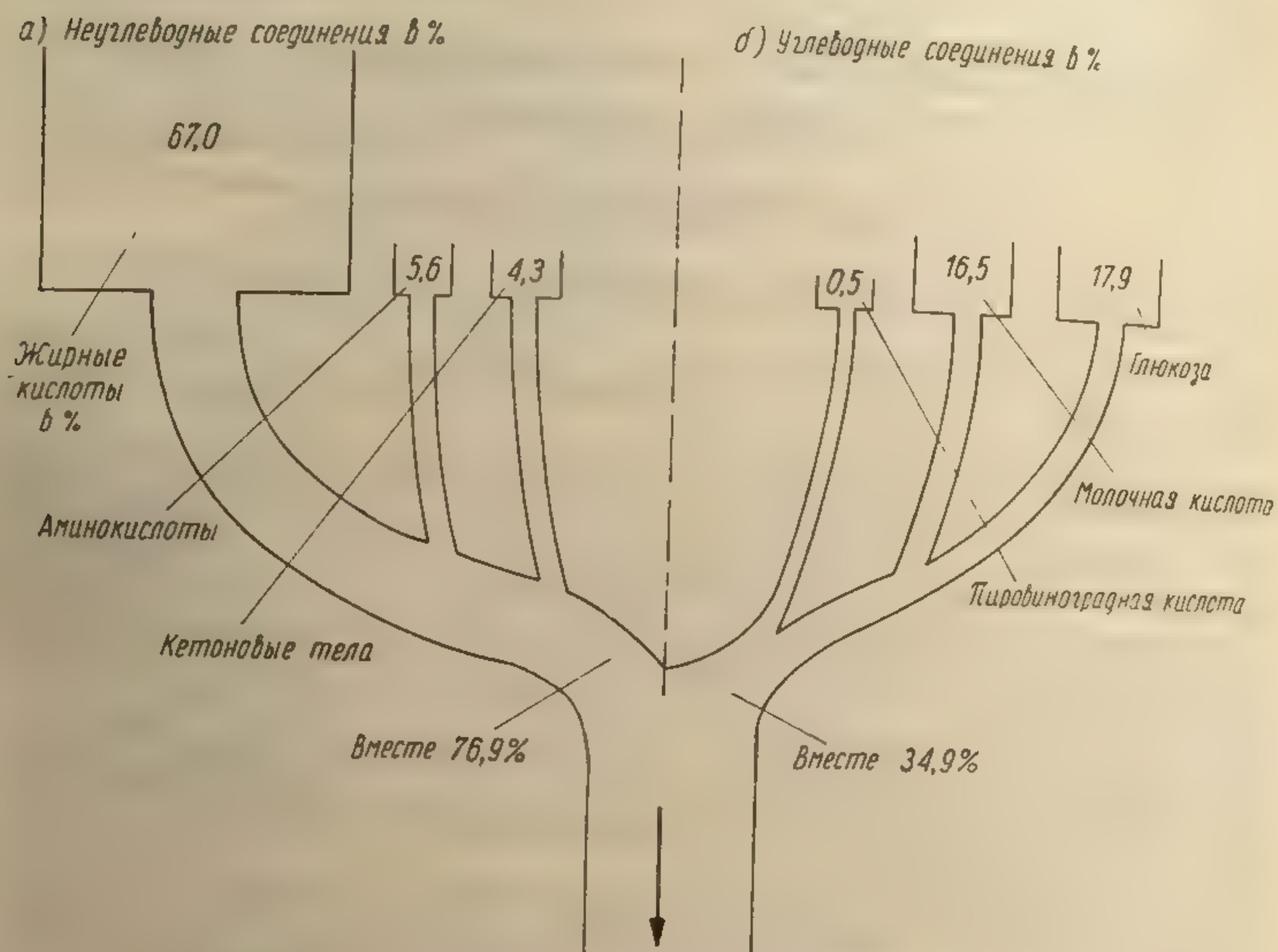


Рис. 32. Использование субстрата сердечной мышцей (Bing).

Исследования Rothlin и Bernhard показали, что сердечная мышца людей, а также собак, особенно хорошо поглощает олеиновую кислоту, которая является ненасыщенной кислотой. Предполагается, что эта кислота используется сердечной мышцей для производства энергии. Из вышесказанного ясно, что сердечная мышца использует прежде всего ненасыщенные жирные кислоты.

Энергия, образовавшаяся благодаря постепенной деградации питательных веществ в ходе кислородного метаболизма, при участии дыхательных ферментов, аккумулируется в высокоэнергетических фосфатных соединениях. АТФ и креатинфосфат (КФ), большое количество которых находится в сердечной мышце, являются резервуаром высокоэнергетических фосфатных соединений.

Актин и миозин являются наиболее важными составными частями ретракционной системы мышцы. Актомиозин является комплексным соединением актина и миозина. Его называют также ретракционным белком мышцы. Миозин проявляет активность аденозинтрифосфатазы, которая расщепляет АТФ на АДФ и неорганические фосфаты, освобождая энергию, необходимую для сокращения мышцы. Активность аденозинтрифосфатазы скелетных мышц

в несколько раз превышает активность ее в мышце сердца. Ингибитором ее является магний, а стимулятором — кальций (40).

Актин получают из мышцы после экстракции миозина и других растворимых белков. Различают две формы: актин G и актин F. Актин F обладает способностью комплексного соединения с миозином, что приводит к образованию актомиозина.

Механизм сокращения мышц еще полностью не изучен. Тем не менее принимают, что при сокращении скелетной и сердечной мышцы происходит взаимодействие между актином, миозином, актомиозином, АТФ и некоторыми

Активное и пассивное изменение длины поперечнополосатой мышцы вероятно заключается во взаимном перемещении волокон актина и миозина. В расслабленной мышце отсутствует сродство (*affinitas*) между актином и миозином, так как имеется высокая концентрация АТФ и расщепление АТФ тормозится физиологическим ингибитором аденозинтрифосфатазы. После инактивации физиологического ингибитора аденозинтрифосфатазы, АТФ расщепляется, что приводит к одновременному соединению и перемещению волокон миозина и актина. Ферментные реакции между миозином, актином и АТФ тесно связаны с изменением механических свойств обоих белков во время сокращения мышцы.

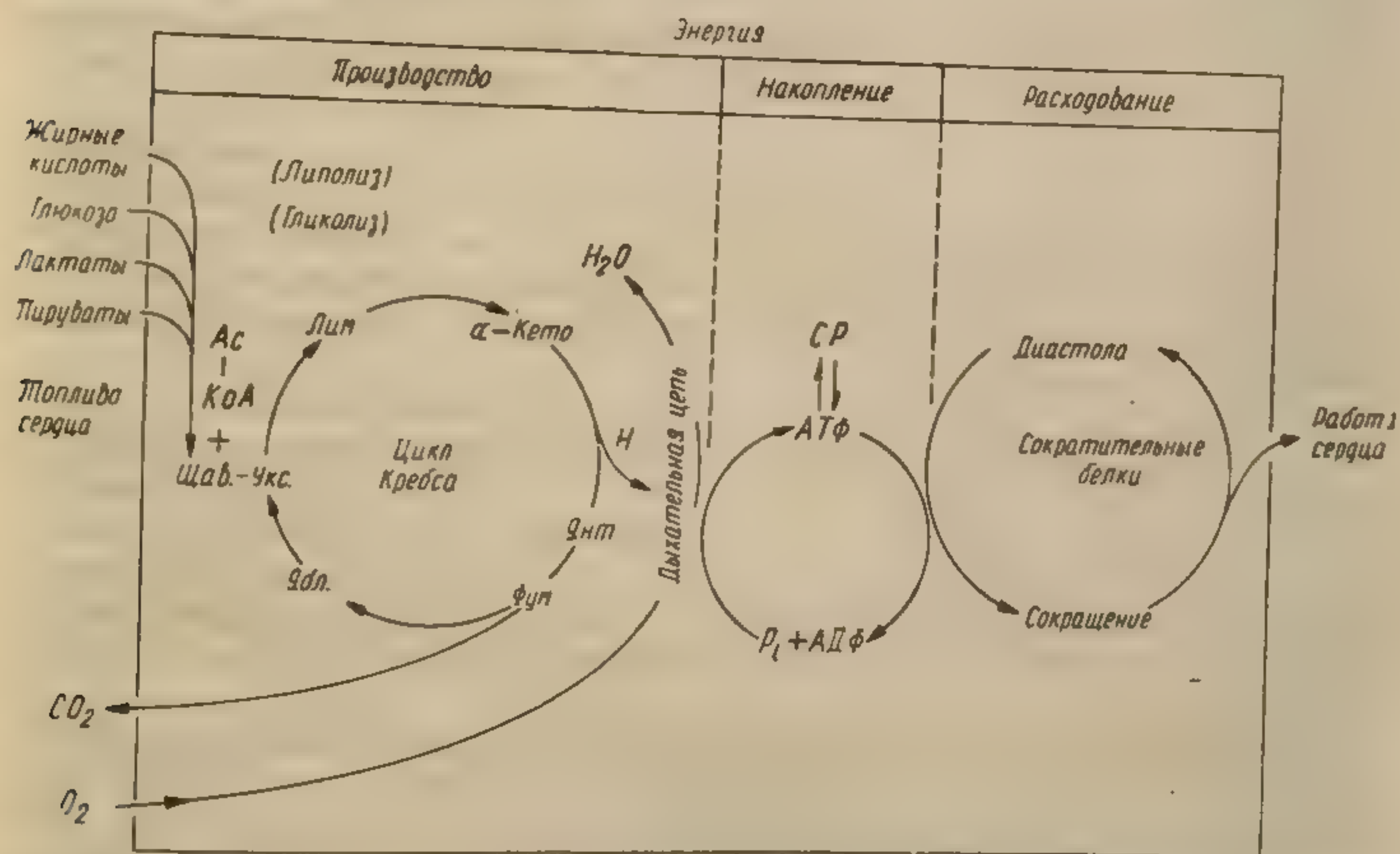


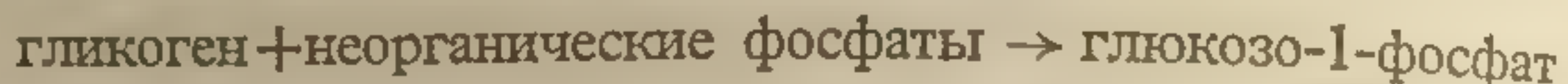
Рис. 33. Схема метаболизма сердечной мышцы согласно Olson в модификации Danforth.

В регуляции взаимоотношений между актином и миозином принимает участие расслабляющий фактор. Этот фактор вырабатывается мышечными гранулами которые являются фракцией тубулярных элементов мышцы. Эти зерна, в присутствии АТФ и магния, приостанавливают, путем образования расслабляющего фактора, расщепление АТФ и сокращение мышечных волокон. Действие вышеуказанного фактора ликвидируют обратимым образом даже небольшие концентрации кальция.

Система: зерна — кальций регулирует активность ретракционных белков. Освобождение кальция инактивирует расслабляющий фактор и вызывает

сокращение. Диастола наступит тогда, когда зерна поглотят ионы, которые таким образом будут удалены из раствора (60).

В 1943 г Cori-Cori (26) обнаружили в скелетных мышцах фосфорилазу, фермент, который катализирует реакцию:



Фосфорилазу можно получить в двух формах: активной и неактивной, которая может активироваться путем добавления адениловой кислоты.

В сердечной мышце Rall и сотрудники впервые обнаружили фосфорилазу, которая, как нам кажется, ничем не отличается от фосфорилазы скелетных мышц.

Важную роль в регуляции активности фосфорилазы в сердечной мышце играют катехоламины. Симпатикомиметические амины с положительной инотропной функцией вызывают увеличение активности фосфорилазы в сердечной мышце. Окончательно не выяснено, действуют ли катехоламины путем активации фосфорилазы, или же непосредственно на механизм сокращения. Тем не менее не подлежит сомнению, что концентрация катехоламинов в крови влияет на функцию сердечной мышцы. Катехоламины, и особенно норадреналин-адреналин и допамин (ДОПА) накапливаются в сердечной мышце. Введение ДОПА и ипроназида вызывает повышение концентрации катехоламинов, которое длится около 1 часа. Можно предполагать, что норадреналин и адреналин накапливаются в сердечной мышце на окончаниях симпатических нервов, тогда как допамин находится в цитоплазме симпатических нервов.

В 1956 г появилось сообщение, что резерпин приводит к освобождению катехоламинов в сердце, чему сопутствует кратковременное фармакологическое действие (11). Раздражение надпочечников и окончаний симпатических нервов вероятно повышает уровень катехоламинов в крови, что вызывает накопление их в сердце. Возможно, что это приводит к быстрому образованию активной фосфорилазы.

Таким же образом действует на изолированное сердце никотин.

Cori доказал, что раздражение скелетной мышцы вызывает накопление глюкозо-6-фосфата. Реакция гликоген-глюкозо-6-фосфат протекает быстрее, чем реакция глюкозо-6-фосфат-молочная кислота, что свидетельствует о том, что фосфофруктокиназа является фактором, ограничивающим образование молочной кислоты во время сокращения. Сумма глюкозо-6-фосфата и молочной кислоты, образованных во время сокращения мышцы, соответствует потере гликогена.

Энергия, заключенная в фосфатных фракциях мышцы, может быть использована для поддержания обмена веществ в покое, а может также быть перенесена на сократительные элементы мышечных волокон, то есть на актин и миозин, причем наступает превращение химической энергии в механическую. Наконец, энергия фосфатных фракций мышцы может быть использована для удержания концентрации ионов внутри- и внеклеточно. При помощи этой энергии, так называемый натриевый насос удаляет натрий из клетки, тогда, как калий остается в ней. Возникает разница ионов, которая является причиной электрического напряжения мышц. Согласно Fleckenstein (35) энергия из АТФ не переносится непосредственно на сократительные элементы. Обмен ионов, который наступает при электрическом раздражении, освобождает энергию, необходимую для сокращения мышечных волокон. При электрическом раздражении натрий переходит в клетку, а калий диффундирует наружу. В промежутке между сокращениями процесс протекает в обратном порядке (88).

РАССТРОЙСТВА ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ В СЕРДЕЧНОЙ МЫШЦЕ

Расстройства обмена веществ в сердечной мышце могут развиваться прежде всего в результате изменений в субстратах крови и изменений в кровеносных сосудах. При недостаточном кровообращении недостаточным будет и приток субстрата для ферментов, которые продуцируют энергию.

Функция ферментов может быть расстроена, так что несмотря на достаточный приток субстратов, продукция энергии будет сниженной. В центре ферментных расстройств находится аденозинтрифосфатаза, которая, путем отщепления молекулы фосфорной кислоты от аденозин-трифосфорной кислоты, доставляет большую часть энергии, необходимой для сокращения мышечных волокон. Активность этого фермента ингибируют вератрин, уретан и другие, усиливают его активность глюкозиды строфантина и наперстянки.

Извращение обмена в сердечной мышце может являться следствием затруднения диффузии в результате отеков межклеточного пространства, изменений в клеточной оболочке, может также зависеть от расстройств в промежуточном обмене веществ.

Хроническая сердечная недостаточность. Сердечная мышца, даже в измененных гемодинамических условиях, вызванных приобретенными или врожденными пороками сердца, как и сердечной недостаточностью, в состоянии экстрагировать из крови необходимые ей субстраты. Экстракция глюкозы, жирных кислот, пировиноградной кислоты и кетоновых тел не изменяется. Использование сердечной мышцей субстратов при недостаточности кровообращения в основном также не отличается от течения этого процесса в здоровом сердце.

Как правило не отмечается расстройств в снабжении сердечной мышцы кислородом; сердце при недостаточности кровообращения может увеличить абсорбцию кислорода. Использование кислорода сердечной мышцей является наиболее важным фактором, регулирующим величину коронарного кровотока. У больных с компенсированным и декомпенсированным сердцем отмечается нормальный коронарный кровоток и правильное использование кислорода сердечной мышцей (12).

Некоторые авторы при сердечной недостаточности не отмечают также изменений в высокоэнергетических фосфатах. Уровень АТФ и креатинфосфата при сердечной недостаточности остается нормальным. Нормальной является также окислительное фосфорилирование в митохондриях сердца в эксперименте на животных.

При сердечной недостаточности основную роль приписывают уменьшенному использованию энергии. Ретракция мышечных волокон нарушается. Отмечено, что при хронической сердечной недостаточности у собаки уменьшается концентрация и вязкость актомиозина (7). Olson и сотрудники (156) вызывали у собак искусственную сердечную недостаточность путем хирургически созданного порока сердца. Они установили, что миозин С (нормальный сердечный миозин) обладает молекулярной массой 225000, тогда как миозин F (миозин недостаточного сердца) обладает молекулярной массой 690000. Это изменение молекулярной массы не влечет за собой изменений в составе аминокислот и не вызывает значительных изменений активности АТФ-азы. Bing отметил уменьшение сократимости актомиозина сердечной мышцы у умерших больных, страдавших сердечной недостаточностью.

Согласно Furchgott и сотрудникам, некоторым экспериментальным формам сердечной недостаточности сопутствует уменьшение количества высокоэнергетических фосфатов (АТФ, АДФ, КФ). Однако при других формах недо-

статочность протекает без изменений в этих фосфатах. Уменьшение сократительной силы мышцы при нормальном уровне высокоэнергетических фосфатов можно приписать недостаточному использованию энергии для выполнения механической работы. Причину этого явления изучали на изолированной попиллярной мышце сердца кошки. Уменьшение ретракционной силы, зависящее от изменения частоты пульса или идиопатической сердечной недостаточности, приписывали расстройству конверсии химической энергии высокоэнергетических фосфатов в механическую энергию (работу). Сердечные средства (гликозиды), нормализовали ретракционную силу, действуют путем повышения эффективности этой конверсии. В случаях изменения ретракционной силы в результате уменьшения внесклеточного Ca , это расстройство приписывается частично уменьшению эффективности конверсии, а частично редукции количества высокоэнергетических фосфатов (157).

Как принято считать в настоящее время, АДФ вырабатывается из АТФ во время сокращения и расслабления мышцы. Из этого следует, что система актомиозина является главным источником АДФ в мышечной клетке. Тут может иметь значение также расстройство образования аденозинтрифосфатазы, активность которой снижается.

При сердечной недостаточности не отмечается увеличенного освобождения АДФ ввиду расстройства свойств ретракционных белков, что можно объяснить отсутствием увеличения использования кислорода.

Однако не все исследователи придерживаются этого мнения. При острой сердечной недостаточности, вызванной дефицитом кислорода, уровень АТФ и креатинфосфата (КФ) уменьшается. Некоторые авторы отмечают уменьшение АТФ также и при хронической сердечной недостаточности (81). Hasellbach (60) считает, что при недостаточности кровообращения мы имеем дело с расстройством системы calcium-factor, локализующейся в гранулах, изменений ретракционного белка не отмечается.

При хронической сердечной недостаточности отмечается увеличение концентрации молочной кислоты в артериальной и венозной крови. Возможно, что при сердечной недостаточности и повышенной потребности в энергии, последняя образуется не только путем окисления питательных субстанций но также в большей степени путем гликолиза.

При далеко зашедшей сердечной недостаточности в крови увеличивается не только количество молочной кислоты, но и пировиноградной кислоты. Однако исследования разных авторов в этом направлении дали разные результаты. Из польских авторов Rafałowicz и сотрудники (110), а также Kardasiewicz и сотрудники (68) установили увеличение количества пировиноградной кислоты в крови при недостаточности кровообращения, причем не отмечалось параллелизма между увеличением количества кислоты и степенью недостаточности кровообращения.

Увеличение уровня пировиноградной кислоты может являться результатом гипоксемии, что влечет за собой расстройство обмена пировиноградной кислоты. Причина увеличения количества пировиноградной кислоты может находиться, по мнению других авторов, в ферментной системе. Под влиянием карбоксилазы, в состав которой входит также кокарбоксилаза (кофермент карбоксилазы), пировиноградная кислота подвергается окислительному декарбоксилированию, причем одна молекула дает уксусную кислоту и двуокись углерода, а другая редуцируется до молочной кислоты. В состав кокарбоксилазы входит витамин B_1 в соединении с двумя молекулами фосфорной кислоты, то есть дифосфотамин. Отсутствие в диете витамина B_1 , как это вытекает из эксперимента Peters, вызывает торможение разложения углеводов на уровне пировиноградной кислоты. Применение с терапевтической

целью кокарбоксилазы (беролазы) вызывает быстрое снижение уровня пировиноградной кислоты в крови.

При хронической сердечной недостаточности часто встречается гиповитаминоз B_1 . Причина дефицита витамина B_1 при сердечной недостаточности неясна. Он может зависеть от недостаточного количества витамина в пище, от расстройства всасывания, и наконец, от увеличенного выделения витамина с мочой в результате частого применения препаратов ртути. Может также играть роль хроническое поражение печеночных клеток, что является причиной недостаточного фосфорилирования тиамин в печени с последующим избыточным выделением его с мочой. Окончательно не выяснено, влияет ли гиповитаминоз B_1 на обмен в больной сердечной мышце и имеет ли терапевтическое значение введение витамина.

При гипертрофии сердечной мышцы, еще перед появлением симптомов сердечной недостаточности, могут появиться расстройства обмена веществ. Экспериментальные исследования на крысах показали, что быстро развивающаяся гипертрофия вызывает увеличение содержания гликогена в сердце, при нормальном уровне молочной и пировиноградной кислот.

Эти расстройства противоположны тем, которые находят при сердечной недостаточности, когда количество гликогена уменьшается, а количество молочной и пировиноградной кислот увеличивается (88).

Гипоксия, которая появляется при острой асфиксии, при легочной недостаточности (хроническая гипоксия) и анемии, вызывают расстройства обмена веществ всей сердечной мышцы.

Экспериментальная 15 минутная аноксия вызывает увеличение количества неорганических фосфатов, молочной кислоты и глюкозо-6-фосфата, при уменьшении количества гликогена. Количество фруктозо-1,6-дифосфата и дигидрооксиацетонфосфата падает незначительно. Количество АТФ уменьшается. Это вероятно является последствием аноксии.

При анемии уменьшается способность крови переносить кислород. Уменьшается также экстракция кислорода. При далеко зашедшей анемии, несмотря на увеличение количества крови, протекающей через коронарные сосуды, снабжение сердечной мышцы кислородом неадекватно потребностям. Сердечная недостаточность является результатом неадекватной продукции энергии в сердечной мышце (11, 12).

При сердечной недостаточности, вызванной анемией, уменьшается количество гликогена и энергетически богатых фосфатов. Увеличивается уровень Г-6-Ф, изменяется отношение фосфоорилазы а к b. Дело доходит до гликолиза и увеличения уровня молочной кислоты в крови и в *sinus coronarius*. Гемодинамически определяется увеличение систолического объема и тахикардия.

Ишемия, которая отмечается при заболеваниях коронарных артерий (инфаркт миокарда), вызывает изменения только на ограниченном участке. Гипоксия приводит к недостаточному снабжению кислородом, при ишемии кроме этого наступает недостаточное снабжение углеводами, жирными кислотами и аминокислотами.

При ишемии сердце имеет в своем распоряжении недостаточно гликогена, необходимого для накопления энергии в процессе бескислородного образования АТФ. Удаление CO_2 , молочной и пировиноградной кислоты при ишемии затруднено, что приводит к смещению рН внутрь клеток. Наступает освобождение некоторых ферментов, GOT, глюкозофосфатизомеразы и многих других ввиду повышения проницаемости клеточной оболочки. Эти расстройства в производстве энергии приводят к уменьшению систолической силы сердца и недостаточности кровообращения. При инфаркте миокарда с острой

сердечной недостаточностью, отмечается уменьшение систолического объема и компенсаторное увеличение периферического сопротивления.

При сахарном диабете отмечаются расстройства концентрации в крови субстратов, необходимых для обмена веществ в сердечной мышце. Использование глюкозы и молочной кислоты сердечной мышцей у больного сахарным диабетом уменьшается независимо от концентрации сахара в крови. Наступает резкое усиление экстракции из крови жирных кислот и также, в меньшей степени, кето-соединений. Принято считать, что процессы фосфорилирования ухудшаются, тем не менее существенных расстройств в промежуточном обмене веществ не обнаружено.

Расстройства в электролитном балансе, которые появляются в случаях тяжелого сахарного диабета, вызывают изменения проницаемости клеточной оболочки. Гипокалемия приводит к сердечной недостаточности путем уменьшения ферментативных процессов, а также к внеклеточному алкалозу и внутриклеточному ацидозу. Изменение рН крови влияет на обмен веществ.

При сахарном диабете основное значение имеют осложнения в виде артериосклероза коронарных сосудов.

Сердце при болезни Бери-Бери. Ввиду отсутствия тиамина замедляется синтез кокарбоксилазы. Кокарбоксилаза включает пировиноградную кислоту в цикл Кребса. Уменьшение количества этого фермента вызывает выпадение тех звеньев обмена, которые в физиологических условиях играют роль в продукции энергии. В сердце больных Бери-Бери отмечается биохимическое расстройство, которое заключается в уменьшении окисления пировиноградной кислоты.

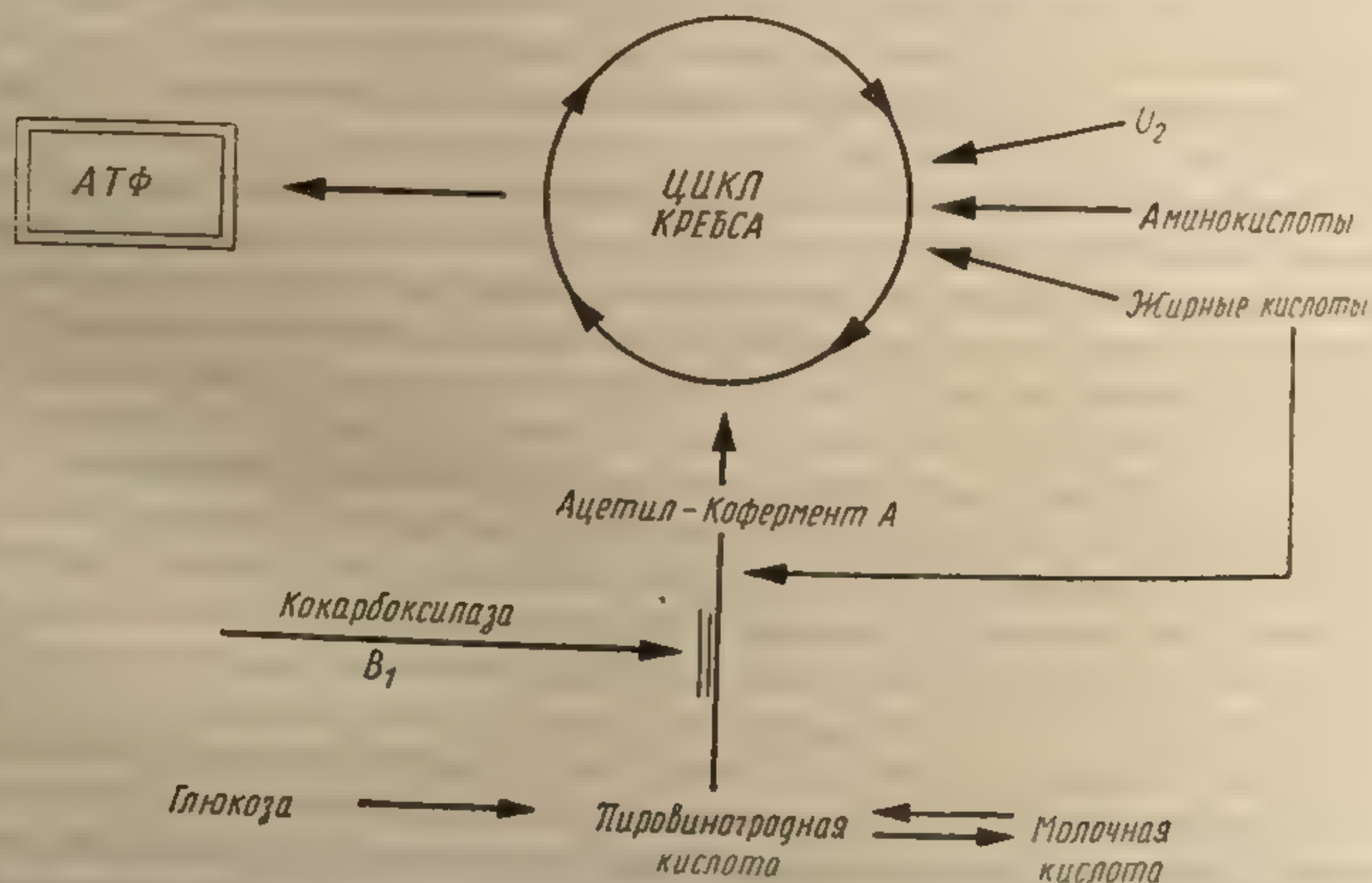


Рис. 34. Схема расстройства обмена веществ при Бери-Бери (Heggin).

Расстройства обмена веществ в сердечной мышце, вызванные тироксином. При гипертиреозе коронарный кровоток, а также использование в сердечной мышце субстратов и кислорода, увеличены. Однако мнения ученых по этому вопросу расходятся.

Диссоциация окислительных процессов и окислительного фосфорилирования может привести к расстройству образования энергии. Поэтому продукция того же количества высокоэнергетических фосфатов нуждается в увеличенном окислении субстратов. Вероятно в сердечной мышце с недоста-

точностью, вызванной гиперфункцией щитовидной железы, количество высокоэнергетических фосфатов падает (30).

Под влиянием тироксина уменьшается отношение P/O , которое указывает на количество эстерифицированного клеткой фосфора на единицу использованного кислорода. Обмен фосфора под влиянием тироксина не уменьшается. Зато использование кислорода резко увеличивается, что приводит к уменьшению указанного отношения P/O .

Желудочковая тахикардия, как и мерцание предсердий, вначале вызывает увеличение активности фосфорилазы, а затем падение ее. Фосфорилаза ведет себя таким же образом, как и в скелетной мышце при увеличении частоты и скорости сокращений. Вероятно в первые секунды сокращения в мышце сердца наступает алкалоз, что способствует синтезу активной фосфорилазы. Усталость вызывает накопление молочной кислоты и падение pH , это приводит к уменьшению количества фосфорилазы. Эти изменения pH являются регуляторным механизмом, который противодействует уменьшению запасов гликогена в сердечной мышце (26).

Изменения в промежуточном обмене углеводов в результате усиленной сердечной деятельности являются результатом аноксии. Как и в скелетной мышце, увеличение частоты сокращений приводит к увеличению концентрации лактатов и глюкозо-6-фосфатов и к уменьшению содержания гликогена в сердечной мышце. Это указывает на то, что фосфофруктокиназа является фактором, ограничивающим образование молочной кислоты во время сокращения мышцы.

АРИТМИЯ И ЭЛЕКТРОЛИТЫ

Согласно теории сформулированной Ходкинсом в 1951 г., между внутренним содержимым клетки и окружающей средой при раздражении возникает разница потенциалов. Причиной этого является неравномерное распределение ионов внутри и вне клетки. Концентрация калия внутри клетки в 30—40 раз превышает концентрацию этого электролита в межклеточной жидкости. Зато концентрация натрия и хлора внутри клетки невелика. Наоборот в плазме концентрация натрия в 10—20 раз превышает концентрацию его внутри клетки, то же самое относится к концентрации хлора; калий в плазме имеется в небольшом количестве.

Основную роль в сохранении разницы в концентрации ионов играет клеточная оболочка, которая отделяет клетку от окружающей среды. В покое эта оболочка проницаема для калия и хлора и малопроницаема для натрия.

При раздражении блуждающего нерва или под влиянием повышенной концентрации ацетилхолина, проницаемость клеточной мембраны для иона K увеличивается. Наступает перемещение калия из межклеточного пространства внутрь клетки (59).

В связи с умеренной анемией сердечной мышцы и увеличенным бескислородным метаболизмом глюкозы, ионы калия проникают внутрь клетки, а ионы натрия перемещаются в межклеточную жидкость. В случаях тяжелой анемии, когда клеточный метаболизм резко замедляется, ионы калия перемещаются из клетки в межклеточную жидкость, а ионы натрия — внутрь клетки. Изменения состава ионов калия и натрия вероятно зависят от обмена глюкозы, которая вместе с калием проникает в клетку (107).

Гипокалемия развивается в связи с увеличенным метаболизмом клетки. Гипокалемии сопутствует усиление импульсации в сердце и развитие аритмии: экстрасистолическая аритмия, мерцание и трепетание предсердий, и даже мерцание желудочков. Чтобы вызвать экспериментально мерцание пред-

сердий необходимо создать гипокалемическую среду, а для того, чтобы прервать мерцание предсердий нужно увеличить концентрацию ионов калия во внеклеточной жидкости, введением раствора соли калия (17, 18).

Препараты, которые в небольших дозах уменьшают повышенную возбудимость сердечной мышцы, как, например, калий в более высоких дозах снижают проводимость. В связи с разным распределением электролитов внутри и вне клеток, существует два резко отличных типа клеточного метаболизма, которые обуславливают усиление возбудимости и снижение проводимости сердечной мышцы. На этом основании Kwoczyński предлагает следующее деление аритмии:

1) расстройства ритма, зависящие от повышенной раздражимости. Сюда относятся преждевременные сокращения предсердий, тахикардия предсердий, трепетание и мерцание предсердий;

2) расстройства ритма, зависящие от снижения проводимости сердечной мышцы, к которым относятся: синусная аритмия и атриовентрикулярный блок.

АРТЕРИОСКЛЕРОЗ

Среди многочисленных теорий патогенеза артериосклероза основное значение имеет метаболическая теория Аничкова. Согласно этой теории первичным аффектом при артериосклерозе является липоидная инфильтрация артериальной стенки. Аничков считает, что липоиды просачиваются из просвета сосудов в стенку и там отлагаются под влиянием гидростатического давления. Фильтрационную теорию подтвердили более новые исследования, которые показали, что после прибавления холестерина к культуре аорты, холестерин отлагается в клетках сосудистой стенки, причем тем в большем количестве, чем больше его концентрация в жидкости среды (114).

Кроме гуморальных расстройств, все большее значение приписывается расстройствам метаболизма артериальной стенки. Так, в последнее время установлено, что в аорте телят синтезируется холестерин, и что при артериосклерозе имеет место также расстройство метаболизма липидов в самой стенке артерии.

Кроме метаболической теории Аничкова большое значение приобрели взгляды, согласно которым основное значение в патогенезе артериосклероза имеют расстройства процесса свертывания крови (Rokitansky, Duguid).

Согласно этим взглядам, первичным аффектом при артериосклерозе является образование мелких субэндотелиальных тромбов и вторичная липоидная инфильтрация их.

Некоторое значение имеет также теория воспалительного происхождения артериосклероза, которую в Польше представляет Rożynek, и которая находит свое подтверждение в трудах советских и немецких авторов. Согласно этим взглядам, в возникновении и развитии артериосклероза играет роль серьезное воспаление с проникновением белковых и липидных масс в эндотелий артерий.

Нет сомнения в том, что артериосклероз является сложным патологическим процессом, и что рядом с биохимическими расстройствами в самом широком значении этого слова, большую роль играют также другие факторы, особенно гемодинамические изменения.

ГУМОРАЛЬНЫЙ СИНДРОМ АРТЕРИОСКЛЕРОЗА

К гуморальному синдрому артериосклероза мы относим расстройства многих биохимических факторов и особенно расстройства в липоидном обмене. К липоидам относится свободный и этерифицированный (жирными кислотами)

холестерин, фосфолипиды, нейтральные жиры (эфиры глицерина и жирных кислот), а также незатерифицированные жирные кислоты в сочетании с альбуминами.

Холестерин. При артериосклерозе уровень холестерина повышается. В зависимости от локализации артериосклеротического процесса (в мозговых, коронарных и периферических сосудах) он колеблется согласно данным нашей клиники в среднем от $207 \pm S^* = 6$ до $223 \pm S = 6,5$. При колориметрическом методе исследования получают большие величины. Здесь следует отметить, что среднее количество холестерина в физиологических условиях равно $172 \pm S = 2,65$. Это соответствует данным других польских авторов (2,141). При артериосклерозе, осложненном заболеваниями печени, коли-

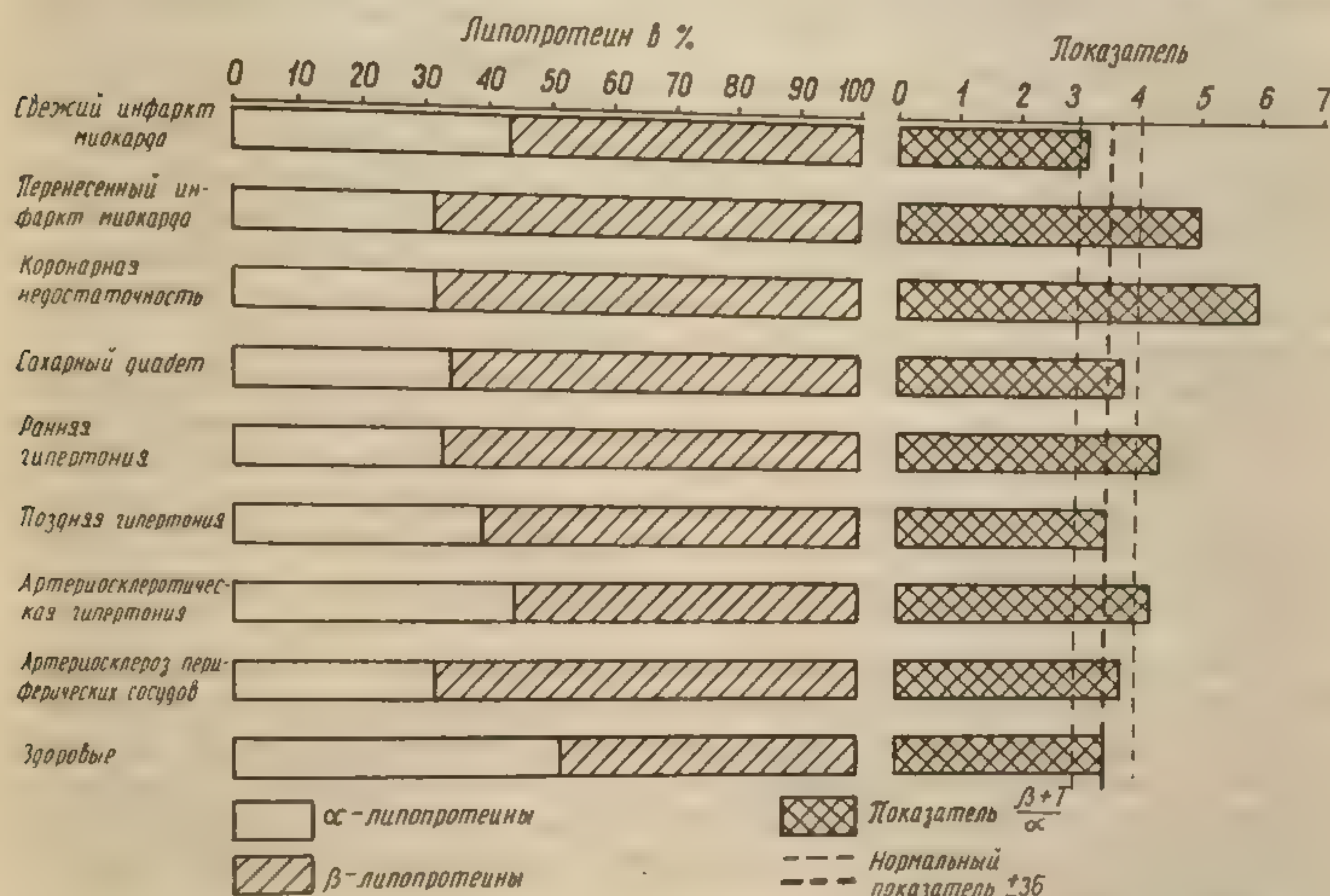


Рис. 35. Липопротеины сыворотки и показатель Le Maigre фракции Т — при артериосклерозе (Е. Szczeklik, В. Bogdanikowa).

чество холестерина в крови не увеличивается, иногда отмечается даже падение количества его в крови ниже нормального уровня. В результате расстройств в системе ферментов, обуславливающей равновесие между свободным и общим холестерином, изменяется отношение свободного холестерина к общему, а именно, в этих случаях уменьшается концентрация этерифицированного холестерина, при нормальном уровне незатерифицированного холестерина. Это указывает на большую роль печени в эндогенном синтезе холестерина.

Уровень фосфолипидов при артериосклерозе увеличивается и доходит в среднем до $274 \pm S = 6,6$. В результате этого увеличивается показатель, обозначающий отношение холестерина к фосфолипидам (Х:Ф с 0,73 на 0,92 в среднем). Увеличение показателя Х:Ф за счет увеличения холестерина или уменьшения фосфолипидов может также иметь значение в патогенезе

* Буква S обозначает среднюю ошибку средней арифметической.

артериосклероза. Фосфолипиды, связывая холестерин, предотвращают выпадение его и откладывание в стенках артерий.

Жирные кислоты. При артериосклерозе увеличивается количество жирных кислот, которое может быть различным, в зависимости от локализации артериосклеротического процесса. По данным нашей клиники, уровень полностью этерифицированных жирных кислот, который у здоровых людей равен в среднем 364 мг%, увеличивается при артериосклерозе периферических сосудов до 546 мг%. У больных после перенесенного инфаркта миокарда он доходит до 615 мг% (исследования нашей клиники, J. Masior).

Непредельные жирные кислоты освобождаются в результате гидролиза триглицеридов под влиянием липопроtein-липазы. Они служат для транспорта жиров и доставляют энергию для процессов тканевого обмена.

Значение непредельных жирных кислот в патогенезе артериосклероза нашло свое отражение во многих трудах. Непредельные жирные кислоты снижают уровень холестерина в крови, а также противодействуют отложению липоидов в артериальной стенке. Sinclair считает, что непредельные жирные кислоты являются витаминами, необходимыми для правильного обмена липидов. Согласно некоторым взглядам артериосклероз является заболеванием, возникшим в результате дефицита жирных кислот. Этот взгляд не является общепринятым, но тем не менее он указывает на большую роль непредельных жирных кислот в патогенезе артериосклероза.

Следовало бы также напомнить о профилактическом действии непредельных жирных кислот. Холестерин, связанный с этими кислотами в виде эфира, подвергается более быстрому обмену. Согласно взглядам Engelberg более быстрый гидролиз триглицеридов непредельных жирных кислот приводит к более быстрому перемещению их в ткани, где они сгорают. Таким образом уменьшается количество материала, необходимого для образования липопротеинов.

Изучение действия растительных масел, содержащих полиеновые жирные кислоты, показало защитное влияние их на липидные показатели (J. Masior).

Количество непредельных жирных кислот при артериосклерозе уменьшается. Содержание непредельных жирных кислот выражается у здоровых людей йодным числом, равным 104. Йодное число при артериосклерозе коронарных и мозговых сосудов равно 90, а при общем артериосклерозе 73 (по данным нашей клиники).

Wiktor и Jacyzyn (146, 147), исследуя общий уровень жирных кислот и степень их непредельности, установили, что общий уровень жирных кислот при артериосклерозе в среднем дважды превышает уровень их у здоровых людей. Зато уровень непредельных жирных кислот при этом заболевании в среднем в два раза меньший, чем у здоровых.

Липопротеины являются комплексными соединениями триглицеридов с белками плазмы. В зависимости от размера молекулы, их можно разделить на крупномолекулярные липопротеины с низкой плотностью, которые соответствуют β липопротеинам при электрофорезе на бумаге, и низкомолекулярные липопротеины с высокой плотностью, которые соответствуют α липопротеинам при электрофорезе на бумаге. Липопротеины являются средством транспорта жиров в организме.

Анализы Gofman при помощи ультрацентрифуги, как и электрофоретические исследования, показали, что при артериосклерозе имеется сдвиг липопротеинов в направлении грубодисперсных (липопротеины крупномолекулярные). При артериосклерозе преобладают молекулы имеющие Sf 10—20, а также 20—100 (128). При электрофорезе липопротеинов установлено увеличение β фракции, которая содержит гораздо больше холестерина, чем α фракция.

Отношение холестерина к фосфолипидам в β липопротеинах является более высоким, чем в α липопротеинах.

При помощи электрофореза на бумаге и окраской по Swahn можно разделить липопротеины на быструю α фракцию, медленную β фракцию и на фракцию, содержащую хиломикроны, так называемый хиломикронный хвост, обозначаемый буквой Т (Trailing). Хиломикронный хвост соответствует нейтральным жирам, которые окружены белковым плащем. В нормальных условиях α фракция составляет 20—35%, β фракция — 50—66% и хиломикронный хвост колеблется в границах 12—20% по отношению ко всем фракциям. При артериосклерозе увеличивается β фракция как и хиломикронный хвост.

β липопротеины имеют Sf порядка 10—20, тем не менее полоса их флотационного спектра не является эквивалентом полосы светового спектра, который соответствует точно определенной длине волны.

Таблица 10

		Холестерин		Свободный холестерин	Фосфолипиды мг %	Х/Ф	Число случаев
		свободный	общий	общий холестерин			
Норма		52 ±s=1,15	172 ±s=2,65	0,31 ±s=0,0004	235 ±s= 8,8	0,73 ±s=0,02	51
Ранний артериосклероз	Эссенциальная гипертензия I, II	+	+				34
		64 ±s=1,9	207 ±s=6	0,31 ±s=0,004	267 ±s= 9,6	0,74 ±s=0,026	
	Стенокардия	+	+				57
		70 ±s=1,9	221 ±s=5,2	0,31	264 ±s= 5,5	0,82 ±s=0,014	
Поздний артериосклероз	Эссенциальная гипертензия III, IV	+	+				42
		71 ±s=1,8	225 ±s=5,0	0,31	274 ±s= 6,6	0,83 ±s=0,02	
	Инфаркт миокарда	+	+			+	37
		73 ±s=2,1	223 ±s=6,5	0,31	258 ±s= 7,8	0,92 ±s=0,028	
Осложненный артериосклероз			+	+			37
		50 ±s=1,7	152 ±s=3,6	0,33 ±s=0,0006	200 ±s=10,2	0,76 ±s=0,03	

Результаты определения липидов в крови у здоровых людей и при раннем, позднем и осложненном артериосклерозе. Буква s обозначает среднее отклонение средней арифметической. Знак + или — обозначает статистически существенную разницу в сравнении с группой здоровых. Знак ++ обозначает статистически достоверный рост. Отсутствие какого бы то ни было знака обозначает отсутствие статистически существенных изменений (124).

Факторы свертывания крови. При артериосклерозе отмечается увеличение свертываемости крови, хотя этот признак не является постоянным. Увеличение свертываемости крови идет параллельно гипербеталипопротеинемии. Увеличивается количество проконвертина и протромбина по Квику. Наиболее характерным является уменьшение фибринолитической активности плазмы, протекающее с β -липопротеинемией. Фибриноген чаще всего остается в норме. Тромбоциты отличаются меньшей устойчивостью.

Согласно данным нашей клиники при артериосклерозе отмечается удлинение времени фибринолиза эуглобулинов плазмы до 6—8 часов (в среднем), при норме 3,5—4 часа. Удлинение времени фибринолиза отмечается в значительном проценте случаев при коронарной недостаточности.

Таблица 11

Результаты определения факторов свертывания крови у здоровых людей и при раннем, позднем и осложненном артериосклерозе

		Факторы свертывания крови						
		катализирующие			тормозящие			
		Активность протромбинового комплекса (Quick) %%	Протромбин по двух-степенному методу %%	Фактор VII %%	Macfarlane Biggs-Test (Thrombin-Generation-Test) минуты	Анти-тромбин (Quick) едид./мин.	Фибринолиз часы	Число случаев
Норма		100 ± s=2,0	100 ± s=2,3	100 ± s=2,0	6—14	15/30	4,5 ± s=0,17	78
Ранний артериосклероз	Эссенциальная гипертония I, II	+ 123 ± s=5,2						
	Стенокардия	+ + 149 ± s=5,8	+ 117 ± s=4,5	+ + 139 ± s=5,5	+ ? 5—17	15/30—45 15/30—45	5,5 ± s=0,28	43
Поздний артериосклероз	Эссенциальная гипертония III, IV	+ + 147 ± s=8,1	+ 118 ± s=4,1	+ 134 ± s=5,2	+ 6—17		6,75 ± s=0,32	58
	Инфаркт миокарда	+ + 159 ± s=5,5	+ 121 ± s=3,8	+ + 143 ± s=7,0	+ 5—19,5	15/20—40 15/25—50	7,0 ± s=0,35	49
Осложненный артериосклероз		— 81 ± s=3,5	— 98 ± s=4,2	— 75 ± s=4,6			8,3 ± s=0,5	50
							6,2 ± s=0,51	29

Буква s обозначает среднее отклонение средней арифметической. Знак + или — обозначает статистически существенную разницу в сравнении с группой здоровых в сторону повышения или снижения. Знак ++ обозначает статистически достоверный рост. Отсутствие какого бы то ни было знака обозначает отсутствие статистически значимых изменений. В тесте Macfarlane-Biggs первое число обозначает минуту, которой соответствует максимум производительности тромбина, второе число — минуту, на которой наступает инактивация тромбина.

В тесте антитромбина приведено время инактивации постоянного количества тромбина (15 единиц тромбина) (124).

Зато в начальной фазе артериосклероза при неосложненной эссенциальной гипертонии (первый и второй период) изменений не обнаружено. При позднем артериосклерозе, и особенно при инфаркте миокарда и артериосклерозе периферических сосудов, время фибринолиза удлиняется в значительной степени. Прирост внебелкового азота в фибринолитической фазе свертывания обнаруживал статистически значимый дефицит фибринолитического прироста. Не обнаружено существенного прироста внебелкового азота в коагуляционной фазе свертывания (130).

Отдельными исследованиями установлено, что у больных с далеко зашедшим артериосклерозом (после перенесенного инфаркта миокарда), введение гепарина приводит лишь к незначительному сокращению времени фибринолиза по сравнению со здоровыми людьми. Это может свидетельствовать о дефиците ферментов при артериосклерозе. О том же свидетельствуют и наблюдения, при которых установлено снижение фибринолитической активности после принятия жира, как и после введения гепарина и принятия жира. Ингибирующее действие жиров является более значительным у больных с артериосклерозом по сравнению с контрольной группой здоровых людей (131).

Gajewski установил, что после приема сметаны (предельные жирные кислоты) наступает торможение фибринолиза и сокращение времени рекальцификации. Ненасыщенные жирные кислоты не оказывают такого действия (38).

Кроме перечисленных, отмечаются расстройства и других факторов свертывания, о которых речь была выше. Между изменениями липидов крови и расстройствами некоторых факторов свертывания, как, например, фибринолиза, отмечается статистически значимая корреляция (126, 127).

Gibiński и сотрудники (49) произвели сравнительные исследования при облитерирующем артериосклерозе нижней конечности. Они установили, что время свертывания крови, которая прошла через склеротически измененный сосуд, было укорочено, а через неизмененный — удлинено. Обнаружено также различие в самопроизвольном коагулолизе, который при облитерирующем артериосклерозе отчетливо усиливался в крови здоровой конечности, и был очень слабым в крови больной конечности. Уменьшение протеолитической активности крови из больной конечности является относительным и зависит от увеличения протеолиза крови из здоровой конечности. Последнее связано с активностью клеток, а не плазмы (145).

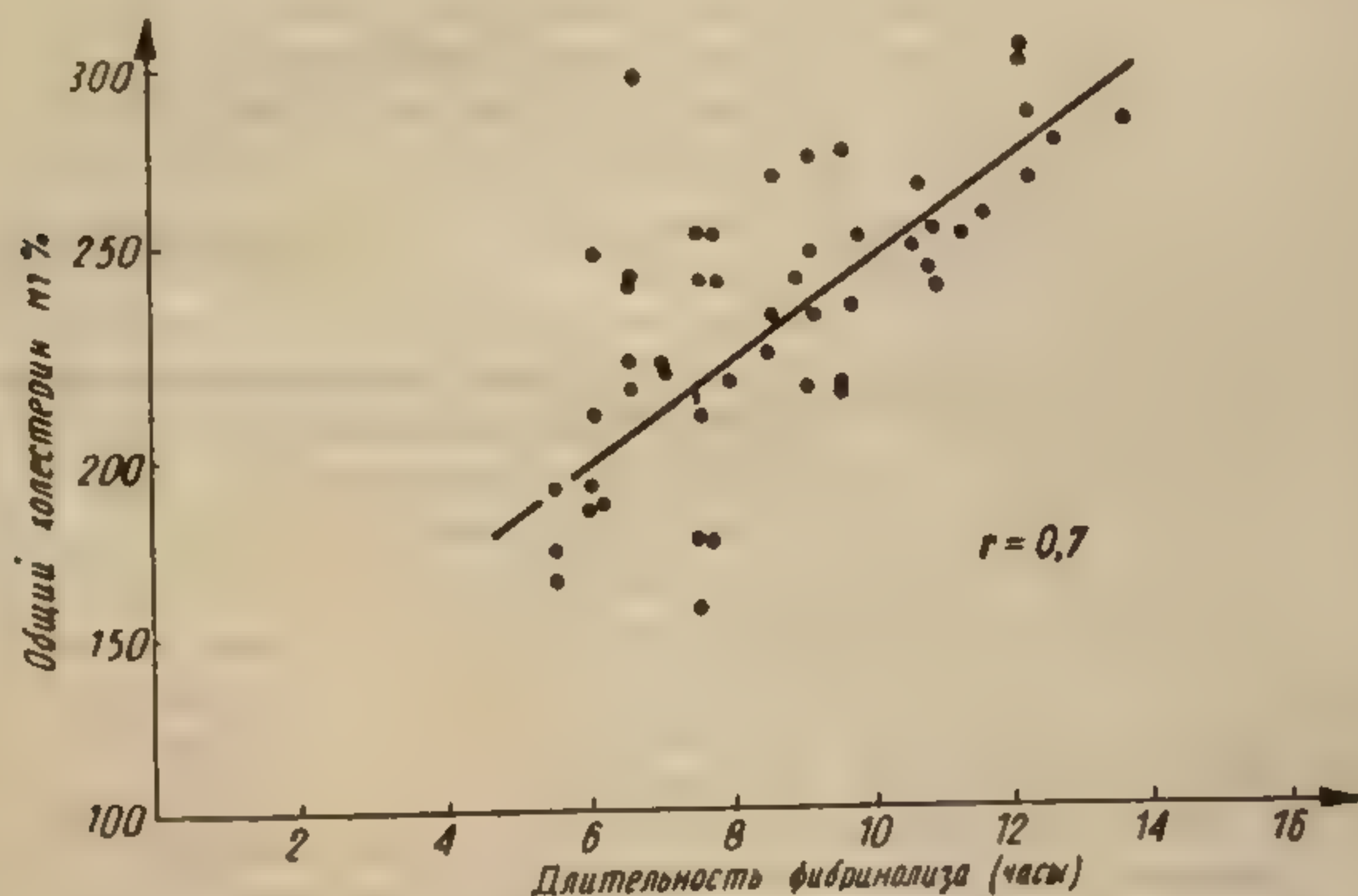


Рис. 36. Корреляция между холестерином крови и длительностью фибринолиза при перенесенном инфаркте миокарда (Е. Szczeklik и А. Janiakowa).

Активность фибринолиза при облитерирующем артериосклерозе была одинаковой в крови, взятой как из больной конечности, так и из здоровой. Зато протеолитическая активность была меньшей в больной конечности. Из этого вытекает, что изменение коагулолитической активности крови идет параллельно с изменениями активности клеточного протеолитического фактора (49).

При артериосклерозе отмечаются ферментативные расстройства в крови. О расстройствах фибринолитической активности отмечено выше. В последнее время была подробнее изучена липолитическая функция.

Липолитическую липазу, или так называемый фактор просветления, открыл в 1942 г Hahn. Это фермент, который расщепляет связь молекулы белка с молекулой триглицерида; при этом освобождаются три свободные молекулы жирных кислот и молекула глицерина. Кроме того, липопротеиновая

липаза изменяет состав липопротеинов крови, уменьшая крупномолекулярную фракцию липопротеинов.

Липопротеин-липаза является тканевым ферментом. В физиологических условиях активность ее в сыворотке невелика, или ее в крови вообще нет. Появляется она в крови после инъекции гепарина, который активизирует

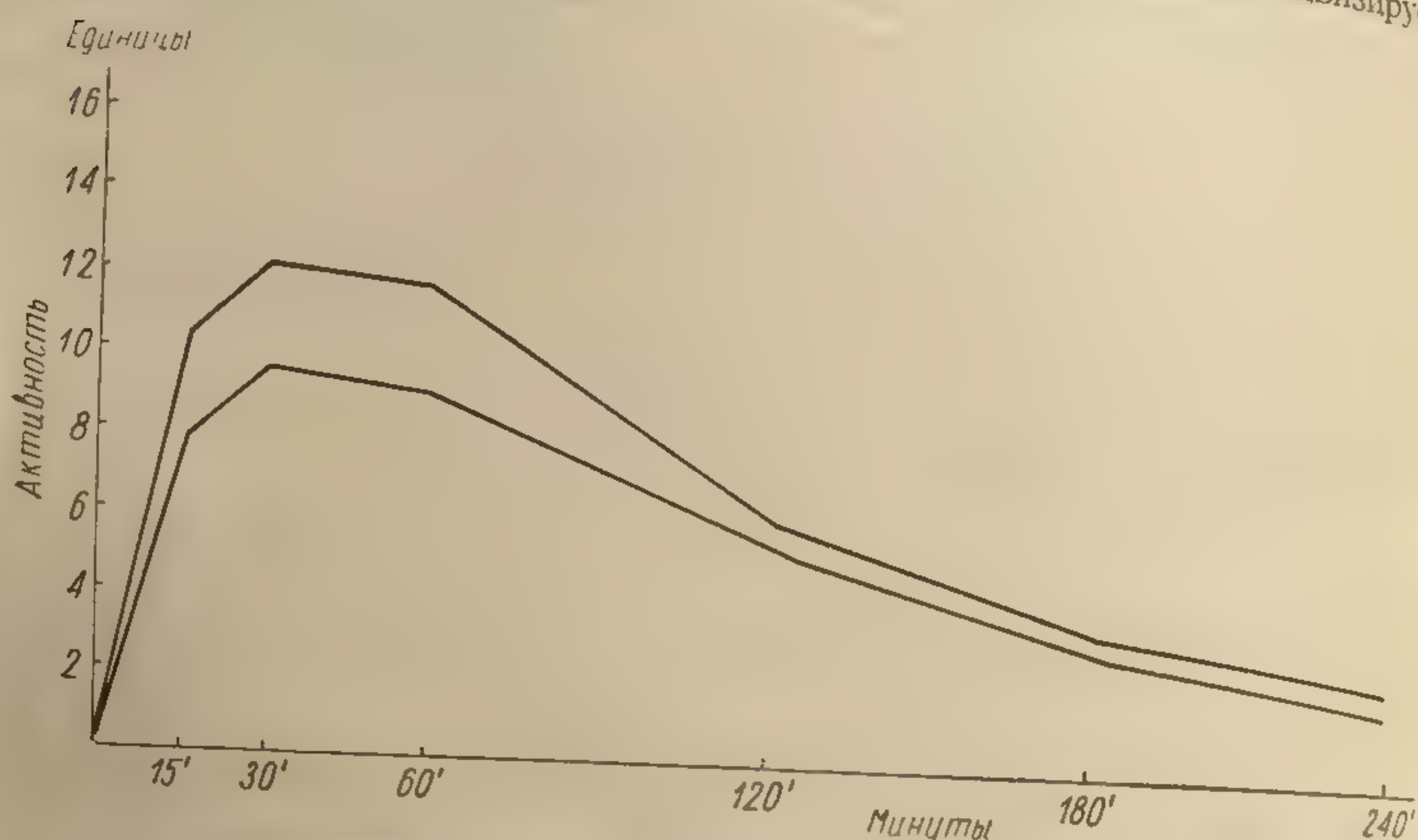


Рис. 37. Липолитическая активность плазмы (в среднем) у здоровых (верхняя кривая) и при артериосклерозе (нижняя кривая) после введения гепарина в дозе 1 мг/кг (Е. Szczeklik и S. Łukasik).

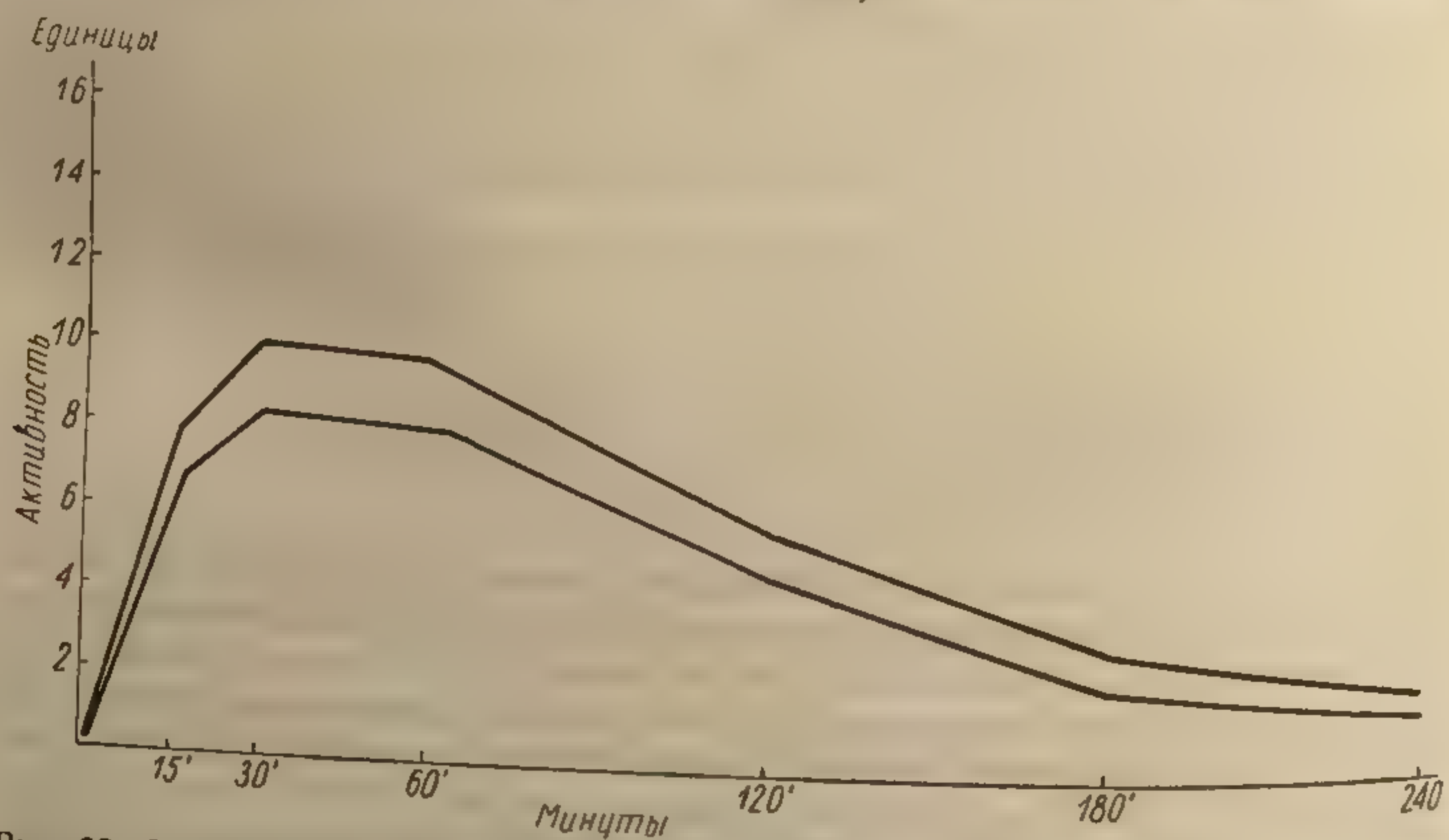


Рис. 38. Липолитическая активность плазмы (в среднем) у здоровых (верхняя кривая) и при артериосклерозе (нижняя кривая) после введения гепарина и нагрузки жиром.

неактивный фермент. Считается, что гепарин является ее коферментом. Печень удаляет из крови липопротеин-липазу. Активность липопротеин-липазы после инъекции гепарина у здоровых людей равна 10 единицам (газометрическим способом S. Łukasik 162). У здоровых людей кривая актив-

ности липопротеин-липазы (после внутривенного введения гепарина в дозе 1 мг/кг), выглядит следующим образом: после первоначального крутого подъема, кривая достигает максимума через 15—60 минут после введения гепарина, после чего постепенно падает до низких величин. У больных артериосклерозом кривая липолитической активности является более пологой, чем у здоровых, кроме того, очерченная ею поверхность, которая свидетельствует об общем количестве образованного фермента, охватывает лишь 76% поверхности группы здоровых людей. Липолитическая активность не зависит от локализации артериосклероза.

Кривая липолитической активности после гепарина при одновременной нагрузке жиром (1/4 литра 22% сметаны), у больных артериосклерозом еще более уплощена. Поверхность, занятая кривой с жировой нагрузкой у больных артериосклерозом равна 60% соответствующей поверхности у здоровых.

Такая картина кривых может свидетельствовать о дефиците липолитических ферментов в тканях у больных с артериосклерозом, особенно в периоде усиления метаболической функции. Она может также свидетельствовать об уменьшенной реактивности тканей на раздражение гепарином (127, 131).

Под влиянием гепарина уровень этерифицированных жирных кислот у больных артериосклерозом снижается, причем величина падения этого уровня равна 2—3 кратной величине средней ошибки. Зато у больных с нормальным уровнем этерифицированных жирных кислот, как и у здоровых лиц, под влиянием гепарина отмечается снижение содержания жирных кислот, лишь незначительно превосходящее среднюю ошибку (146, 147). Эти данные соответствуют данным других авторов и свидетельствуют о том, что при низкой концентрации и малой степени дисперсности молекул триглицеридов в сыворотке, относительный рост уровня липопротеин-липазы после гепарина вероятно не имеет существенного значения.

Анализы при облитерирующем артериосклерозе свидетельствуют о статистически существенном снижении активности липопротеин-липазы. Эти изменения не связаны с местными расстройствами, так как отмечаются одинаково как в здоровой, так и в больной конечности (153).

Экспериментальными исследованиями у животных установлено также снижение активности липопротеин-липазы у кроликов с холестериновым артериосклерозом. Отмечено также видовые различия, так, например, аорта крыс обладает значительной липолитической активностью, аорта кроликов — небольшой активностью.

Уменьшение активности липолитической липазы отмечается также при других заболеваниях; при разных инфекциях, воспалительных заболеваниях разных органов, анемии и других.

Эластаза* (Панкреатопептидаза Е) является протеолитическим ферментом, недавно выделенным из поджелудочной железы. Этот фермент обладает способностью растворять эластин артериальных стенок. Он находится в α клетках поджелудочной железы как профермент, во внутрисекреторной части железы он отсутствует (5). Содержание этого фермента в поджелудочной железе у больных артериосклерозом вероятно уменьшается. Эластаза вероятно принимает участие в распределении белков в артериальной стенке и таким образом при усилении ее активности наступают сосудистые изменения.

Белки крови. При помощи электрофореза, как и при помощи ультрацентрифугирования, при артериосклерозе обнаружены расстройства в отдельных белковых фракциях. Количество альбуминов падает, а количество глобулинов β , α_2 и α_1 увеличивается.

* Старое название.

РАССТРОЙСТВА МЕТАБОЛИЗМА СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ

Исследования последних лет указывают на то, что артериальная стенка не является только пассивным фильтром, а обладает собственным метаболизмом. В стенке артерий эластического и эластическо-мышечного типа обнаружен синтез фосфолипидов, холестерина и его эфиров, который увеличивается при диете, богатой холестерином. Липиды, возникшие в артериальной стенке, элиминируются в просвет сосудов. Уменьшение местного катаболизма липидов в артериальной стенке может являться существенным фактором в развитии атеросклероза, даже более важным, чем подвоз липидов и физикохимическое состояние плазмы крови. Изменения метаболизма липидов могут зависеть от влияния многих гормонов (143).

Согласно Paterson (100) отложение жиров в артериальной стенке не зависит от уровня жиров в крови, а является результатом повторяющихся кровотоков. Кровотечения во внутреннюю оболочку артерий можно обнаружить в каждом периоде атеросклероза. Липиды, откладывающиеся в тромбе, могут быть местного происхождения (расстройства в местном синтезе), или же, согласно теории инкрустации, проявлением дегенеративных изменений тромба артериальной стенки.

Гиперлипемия стимулирует синтез липидов в эндотелии артериальной стенки. Жир, имеющийся в отложениях липидов в эндотелии, происходит из плазмы крови. Жиры же, находящиеся под атероматозными инфильтрациями в сосудистой стенке, синтезируются на месте. Наиболее новые данные свидетельствуют о том, что абсорбция липидов из крови, как и их синтез в стенке артерий, являются процессами, которые протекают параллельно (154).

Анализ коагуляционной активности артериальной стенки показали, что по мере развития атеросклероза уменьшается тромбопластическая активность тканей и увеличивается активность антитромбопластических субстанций. Эти изменения прежде всего отмечаются во внутреннем слое сосудистой стенки (101). Атероматозная ткань аорты при экспериментальном атеросклерозе удлиняет время фибринолиза плазмы и снижает протеолиз протеолитической фазы (66).

Артериальная стенка обладает ферментативной активностью, которая изменяется при атеросклерозе. Ферментативную активность можно определить как биохимическими, так и гистохимическими методами. Тем не менее существуют еще большие трудности в установлении различия в ферментативной активности отдельных слоев и клеток, что может иметь большое значение.

Липолитическая активность артериальной стенки зависит от вида животного и уменьшается с возрастом. У кролика при экспериментальном атеросклерозе развиваются расстройства липолитической активности, которые идут параллельно с расстройствами эстеролитической активности. В экстрактах из аорты с атеросклерозом отмечено уменьшение активности лактат-дегидрогеназы, как и глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы; уменьшается активность фосфоглюкомутазы и увеличивается активность пирофосфорилазы уридин-фосфоглюкозы (73). При атеросклерозе у кроликов в атероматозных очагах увеличивается активность фосфоаминопептидазы (86).

Некоторые видят причину атеросклероза в расстройствах ферментов внутренней оболочки артерии, переносящих или вырабатывающих липиды. Собирающиеся во внутренней оболочке липиды могут привести к поверхностным изменениям ее с отложением фибрина, или во втором периоде к глубоким изменениям, заключающимся в фиброзе, некрозе и кальцификации. В третьем периоде наступает отложение больших количеств липидов.

В развитии артериосклероза играют роль расстройства обмена мукополисахаридов, которые вызывают изменения в структуре мезенхимы артерий. Уже в начальном периоде артериосклероза одними из первых являются расстройства метаболизма мукополисахаридов базального слоя артериальной стенки. Появляются расстройства равновесия и взаимоотношений в межволоконных элементах базального слоя, а затем изменения их состава, распределения и степени их полимеризации. При далеко зашедшем артериосклерозе отмечаются качественные изменения мукополисахаридов (85). Мукополисахариды, скопившиеся в начале образования атероматозных инфильтратов, могут усиливать отложение липопротеинов плазмы в связи с их способностью формирования комплексных связей с липопротеинами. В этом процессе играет также роль их способность тормозить активность липопротеин-липазы артериальной стенки (55).

Деполимеризация мукополисахаридов базального слоя, вызванная гиалуронат-лиазой, может увеличить проницаемость сосудистой стенки, что облегчает отложение липидов и белков (19).

Мукополисахариды обладают противотромбозными свойствами, а внутривенное их введение крысам стимулирует образование факторов просветления. При уменьшении количества кислых мукополисахаридов во внутренней оболочке при артериосклерозе могут уменьшиться нормальные противотромботические ее свойства, что облегчает отложение фибрина. Это может также привести к уменьшению липолитических свойств артериальной стенки (50).

Согласно Mandel (89) уже в физиологических условиях возможность артериальной стенки использования энергии, накопленной в АТФ, ГТФ и УТФ, невелика, ввиду того, что стенка артерий использует $3/4$ глюкозы путем анаэробного гликолиза. С возрастом повреждение ферментативной системы различными токсическими факторами приводит к расстройствам ферментного оснащения артерий, к снижению образования энергии, что выражается уменьшением АТФ, ГТФ и УТФ. Уменьшение образования энергии влечет за собой снижение синтеза белков, что в свою очередь ведет к уменьшению активности некоторых ферментов и связыванию некоторых аминокислот. Образуется порочный круг, который приводит к дальнейшему уменьшению тканевой энергии. Наступают расстройства в синтезе белков и мукополисахаридов с появлением групп свободных кислот, которые имеют большое сродство к липопротеинам.

АРТЕРИАЛЬНАЯ ГИПЕРТОНИЯ

Согласно принятой в настоящее время классификации, артериальная гипертония может быть эссенциальной или вторичной. Вторичная гипертония имеет место при некоторых заболеваниях почек, сердца и артерий, при некоторых гормональных заболеваниях, как синдром Кушинга, феохромоцитоме и многие другие. Первичная гипертония, или так называемая гипертоническая болезнь, является заболеванием, при котором мы не находим перечисленных выше причин гипертонии. Это заболевание принято делить на два периода: период без осложнений (раньше I—II периоды) и период с осложнениями (раньше III и IV периоды).

Патогенез эссенциальной гипертонии еще окончательно не выяснен. Известно значение кортико-висцеральной теории, объясняющей механизм развития эссенциальной гипертонии. Кроме неврогенных расстройств, патогенетическое значение имеют ферментные и гуморальные расстройства в сочетании с электролитическими расстройствами и изменениями в почках.

В 1898 г Тигерштедт и Бергман обнаружили в крови из почечных вен наличие прессорной субстанции, которую называли ренином. Они тогда высказали предположение, что освобождение большого количества ренина может привести к увеличению артериального давления. Goldblatt и сотрудники (51) в 1934 г вызвали экспериментальную гипертонию у собаки путем сдавливания почечной артерии. Сдавление обеих почечных артерий приводило к стойкому повышению давления у собаки; при сдавлении одной почечной артерии гипертония бывала преходящей. Исследования многих авторов подтвердили и расширили эксперимент Goldblatt.

Page и Braun Menendes (99) в 1939 году доказали, что артериальное давление увеличивается, если к ренину прибавить плазму. Имеющийся в плазме гипертензиноген переходит под влиянием ренина в гипертензин, который приводит к повышению давления.

Из экспериментальных данных Floyer (36) вытекает, что как анемизированная почка, так и отсутствие обеих почек вызывает повышение артериального давления. При наличии одной здоровой почки развитие гипертонии заторможено. Частичное закрытие почечной артерии вызывает кратковременное увеличение давления. При длительной гипертонии развивается внепочечный прессорный механизм.

Прессорные тела возникшие при сдавлении почечной артерии одной почки, могут вызвать спазм сосудов другой, здоровой почки, и при длительной гипертонии приводят к изменениям здоровой почки характера *nephrosclerosis*.

Ренин является протеолитическим ферментом и вырабатывается в *macula densa* или в клетках, окружающих *vas afferens*. Выделяется он в кровь. При гипоксии почки количество его резко увеличивается. Ренин прессорно неактивен и вызывает конверсию гипертензиногена (α_2 -глобулина) в гипертензин. Под влиянием гипертензиногена вначале образуется декапептид-гипертензин I (прессорно неактивное вещество), который в свою очередь, при воздействии конверсионного фермента плазмы (*convertine enzyme*), превращается в октапептидгипертензин II. Гипертензин или ангиотонин является полипептидом, который суживает кровеносные сосуды; гипертенгиназа инактивирует его. Гипертенгиназа является пептидазой. Имеется в почках, поджелудочной железе и селезенке.

В эксперименте Goldblatt увеличивается концентрация ренина не только в почке, но также и в венозной крови сдавленной почки. Это зависит от аноксии почки. У людей при шоке вероятно также увеличивается концентрация ренина в крови вследствие анемии почек.

На основании многочисленных экспериментальных исследований, целью которых было вызвать анемию почек, выдвинута гипотеза, что в результате недостаточного снабжения почек кислородом, в почке увеличивается количество ренина, который, переходя в кровь и активируя гипертензиноген, вызывает повышение кровяного давления.

Обнаружен повышенный уровень гипертензина у собак с гипертонией, вызванной анемией одной почки, как и у людей с эссенциальной гипертонией и особенно при злокачественной гипертонии (118). Под влиянием анемии почки у собак быстро увеличивается количество ренина в крови, однако потом уровень ренина постепенно снижается (140). Другие авторы в своих опытах установили, что количество гипертензина в плазме у собак при острой гипертонии снижается, а при хронической — повышается (58).

Эти противоречивые иногда результаты анализов уменьшают значение рассматриваемой ферментативной системы в развитии гипертонии. Гипертензин вероятно играет роль в развитии острой почечной гипертонии, но как нам кажется, не имеет значения в поддержании хронической почечной гипер-

тонии, а также при эссенциальной гипертонии. При этой последней может играть роль увеличение выделения прессорных тел или же отсутствие анти-прессорных тел, которые имеются в здоровой почке.

В анемизированной почке у животных с экспериментальной почечной гипертонией, образуется еще другой фактор, повышающий кровяное давление VEM (*vaso excitator material*), находящийся в проксимальных почечных канальцах. Антагонистическим действием обладает VDM (*vaso depressor material*), образующийся в печени, селезенке и мышцах. Эти факторы увеличивают или уменьшают чувствительность мелких кровеносных сосудов к адреналину (Shorr и сотрудники).

Установлено, что VDM является ферритином, который служит своеобразным депо железа для организма. Коштойниц и Розанова обнаружили при гипертонии увеличение сульфгидрильных групп, повышающих чувствительность кровеносных сосудов к адреналину.

Прессорные амины, то есть декарбоксилированные аминокислоты, вызывают кратковременное увеличение кровяного давления. Они имеются в большом количестве в почках и инактивируются аминоксидазами.

Введение в ишемическую почку L-диоксифенилаланина (ДОФА) вызывает резкое повышение давления. В почке эта субстанция превращается в L-диокситирамин, который в результате аноксии не подвергается окислению и проникает в кровяное русло. Внутривенное введение этого моноамина вызывает у людей и животных острое повышение кровяного давления.

Симптомы, развивающиеся после введения прессорных аминов, отличаются от таковых при хронической гипертонии. До настоящего времени не удалось обнаружить прессорных аминов у больных с гипертонией.

Серотонин-5-гидрокситриптамиин является прессорным амином, с фармакологическим действием, направленным на гладкие мышцы сосудистой стенки и слизистую оболочку кишечника. Эта субстанция была выделена из канкроида тонкого кишечника.

Увеличение количества 5-гидрокситриптамина в крови вызывает не повышение давления, а кратковременное падение давления. Резерпин освобождает 5-гидрокситриптамиин в мозгу (54). Эта субстанция вероятно оказывает влияние на проницаемость и обмен в некоторых клетках нервной системы, которые принимают участие в регуляции кровяного давления. Механизм действия 5-гидрокситриптамина неясен, тем не менее он играет роль в патогенезе гипертонии.

Норадреналин, вводимый капельным путем внутривенно, вызывает быстрое повышение систолического и диастолического давления в связи с увеличением периферической резистентности. Введение адреналина вызывает лишь рост систолического давления, без заметных изменений диастолического давления. Существует предположение, что эссенциальная гипертония может зависеть от усиленного выделения норадреналина, хотя этому противоречит тот факт, что при эссенциальной гипертонии выделение норадреналина с мочой не всегда бывает увеличенным (54).

Альдостерон. При гипертонии увеличивается циркуляция крови в скелетных мышцах, с чем связано уменьшение объема циркулирующей крови и уменьшение объема крови, снабжающей голову. Это приводит к нарушениям механизма гомеостаза. В результате этого увеличивается выделение альдостерона, как и норадреналина. Местом действия альдостерона являются дистальные почечные канальцы, в которых он вызывает увеличение реабсорбции натрия с последующей задержкой воды в организме. В физиологических условиях выделение альдостерона и задержка натрия и воды восстанавливают нормальный объем крови. В патологических условиях этот механизм

нарушается. При гипертонии удерживается усиленная продукция альдостерона, несмотря на нормальный объем крови (54).

Многочисленные клинические наблюдения и экспериментальные данные указывают на значение альдостерона при артериальной гипертонии. Альдостерон, как и дезоксикортикостерон влияет на метаболизм натрия и калия. При первичном гиперальдостеронизме отмечается гипертония. У больных с эссенциальной гипертонией имеется зависимость между содержанием натрия в пище и величиной гипертонии. Известно также влияние диеты, бедной натрием, на величину гипертонии.

Выделение альдостерона с мочой резко повышено в 55% случаев гипертонии разной этиологии (41). Тем не менее считается, что усиленное выделение альдостерона не является патогенетическим фактором при эссенциальной гипертонии. С другой стороны, из данных некоторых авторов вытекает, что усиленному выделению альдостерона обычно сопутствует злокачественная гипертония. В большинстве случаев далеко зашедшей гипертонии, как и злокачественной гипертонии, наблюдается усиленное выделение альдостерона с мочой (42, 84). Согласно взглядам многих авторов альдостерон не является причиной гипертонии, а скорее дополнительным фактором в патогенезе этого заболевания.

Альдостерон вызывает перемещение воды в организме из внутриклеточного пространства во внеклеточное и частичное замещение внутриклеточного калия натрием.

Имеется корреляция между гипертонией и корой надпочечников. Так гипертония имеет место при первичном гиперальдостеронизме. При эссенциальной гипертонии, как и при других формах гипертонии, наблюдается усиленное выделение альдостерона. При гипертонии отмечается увеличение количества воды и натрия, и уменьшение количества калия в артериальной стенке и мышцах. Гипертония является характерным симптомом синдрома Кушинга, гипотония — болезни Аддисона.

Почки при гипертонии играют роль в выделении ренина, кроме того они могут влиять на кровяное давление путем инактивации альдостерона. При гипертонии могут развиваться вторичные изменения в почках, которые ухудшают течение этого заболевания, с другой стороны, при заболевании почек, в результате инактивации альдостерона, может развиваться гипертония.

В гомеостазе артериального давления большую роль играют артериальные стенки. Как известно, прессорецепторы аорты и *sinus caroticus* регулируют общее давление автоматически, рефлексным путем. Из экспериментальных данных следует, что прессорецепторы не обладают непосредственной чувствительностью к внутриартериальному давлению, а реагируют на деформацию артериальной стенки и увеличение давления внутри нее там, где они находятся. Каждое увеличение или уменьшение давления внутри стенки аорты и *sinus caroticus* вызывает рефлекторную гипертонию или гипотонию. Уменьшение давления внутри стенки прессорных артерий может являться основным условием развития артериальной гипертонии (63).

Равновесие натрия и калия в плазме и артериальной стенке, подчиняющееся гормональной регуляции и особенно зависящее от равновесия кортикостероидов-альдостерон-андрогены, вероятно является фактором, регулирующим сокращение сосудов под влиянием прессорных субстанций (143).

Регуляция артериального давления зависит от метаболизма сосудистой стенки. Увеличение межклеточного количества натрия под влиянием минералокортикостероидов повышает сосудистый тонус и увеличивает сократи-

тельную реактивность артерий на катехоламины. Норадреналин, снижая концентрацию калия в клетках, является вторым фактором, влияющим на взаимоотношение натрия и калия. Гипертонию при синдроме Кушинга, альдостеронизме и при феохромоцитоме можно приписать увеличению количества натрия в клетках, вызванному кортикоидами, и, возможно, потере клеточного калия, зависящей от катехоламинов (108).

ИНФАРКТ МИОКАРДА

Исследования ферментативной активности сыворотки крови при инфаркте миокарда нашли широкое применение в клинической медицине. Они являются таким же прогрессом в диагностике инфаркта, как введенное несколько десятков лет тому назад электрокардиографическое исследование.

Анализ ферментов при инфаркте миокарда является ценным дополнением в диагностике, особенно в тех случаях инфаркта, когда заболевание протекает атипично и электрокардиограмма также является нетипичной.

Электрокардиограмма может давать некоторые характерные данные при массивном инфаркте, поражающем сердечную мышцу во всю ее толщину, или же ее наружную часть (субперикардиальную). При инфарктах же внутримышечных, субэндокардиальных, при небольших некротических очагах или очагах, локализирующихся в тех местах, где регистрация функциональных токов подводит, электрокардиография часто не приносит убедительных данных и не оказывает помощи в оценке клинических симптомов. Также и в тех случаях, когда электрическая кривая свидетельствует о блокаде пучка, или деформации, вызванной перенесенным в прошлом инфаркте, электрокардиограмма может быть нетипичной и трудной для оценки. Наконец, в некоторых случаях инфаркта типичная электрокардиограмма появляется лишь через несколько дней от начала коронарных болей, или формируется постепенно, в течение нескольких дней, доставляя большие сомнения при интерпретации. Имеются и такие случаи при инфаркте миокарда, когда предыдущее лечение (дигиталис) изменило вид электрической кривой, что нередко также затрудняет правильную оценку и приводит к ошибочному диагнозу инфаркта миокарда, которого нет. Следует, однако, признать, что перечисленные трудности электрокардиографического исследования не уменьшают огромного значения этой методики в диагностике инфаркта, и электрокардиография до настоящего времени остается безконкурентным методом.

Определение ферментной активности является превосходным дополнением других способов исследования. Изменение ферментной активности является одним из ранних объективных доказательств инфаркта миокарда, разумеется в сочетании с клинической картиной, и опережает электрокардиографические данные. Еще более ранним биохимическим симптомом является повышение уровня гистамина в крови и увеличение выделения с мочой 5-гидроксииндолауксусной кислоты. „Ферментологическая диагностика инфаркта“ является очень ранней, однако изменения ферментной активности сыворотки являются кратковременными, так как они чаще всего связаны с некрозом сердечной мышцы или анемией, которая быстро проходит. Повышенная активность некоторых ферментов длится несколько дней, других продолжается 7—10 дней от начала коронарных болей, после чего возвращается к норме. Поэтому обычно производится исследование двух или трех ферментов одновременно. В зависимости от дня инфаркта, анализ активности одного фермента может дать отрицательный результат, тогда, как активность другого может быть повышенной.

Чаще всего исследуют активность GOT, лактатдегидрогеназы и фосфогексоизомеразы. В раннем периоде инфаркта исследование GOT показывает усиленную ее активность, но уже через несколько дней активность трансаминаз может упасть до нормы, тогда как активность фосфогексоизомеразы и лактатдегидрогеназы еще остается повышенной.

Другой отрицательной стороной ферментативного анализа является его неспецифичность. Освобождение ферментов из распадающихся клеток, не является признаком, характерным только для инфаркта, но встречается при многих других заболеваниях, как например, при гепатитах, нефритах, или при других патологических состояниях, сопровождающихся клеточным некрозом. Поэтому при интерпретации данных ферментологического анализа следует исключить наличие в организме других некротических очагов.

То же самое относится к острой гипоксии. Острая гипоксия, вызванная непроходимостью венечной артерии, может привести к изменениям проницаемости клеточных оболочек сердечной мышцы и освобождению ферментов. Установлено, что острая гипоксия печеночных клеток, вызванная шоком и резким падением артериального давления, также приводит к освобождению ферментов и увеличению активности их в сыворотке крови. Из этого вытекает, что острая гипоксия такого паренхиматозного органа, как печень, должна также быть принята во внимание при обнаружении повышенной активности ферментов. На возможность некоторых ошибок, связанных с применением определенных лекарственных препаратов, действием некоторых экзогенных факторов, и так далее, останавливаемся в другой главе.

Периодический анализ ферментативной активности при инфаркте миокарда дает возможность следить за некротическим процессом, его регрессом или нарастанием. Таким образом он помогает в установлении прогноза заболевания. Кроме того, как показали экспериментальные данные и многочисленные клинические наблюдения, величина инфаркта коррелируется с величиной усиления ферментативной активности.

Наконец, анализ ферментативной активности может быть полезным в дифференциальном диагнозе инфаркта миокарда и острой коронарной недостаточности. Отсутствие ферментативных изменений свидетельствует о последней. Тем не менее, в некоторых случаях острой коронарной недостаточности, при которой возникают так называемые микроинфаркты, ферментативная активность сыворотки также увеличивается. Анализ ферментов может также оказаться полезным в дифференциальном диагнозе с острым панкреатитом, прободной язвой желудка и так далее, при соответствующем подборе анализируемых ферментов. Например, при остром панкреатите усиление активности диастазы является характерным для этого заболевания, и не характерно для инфаркта миокарда. Зато повышение активности трансаминаз имеет место при обоих заболеваниях.

Среди ферментов, активность которых изменяется при инфаркте миокарда чаще всего анализируют следующие:

Трансаминазы (аминотрансферазы). Это ферменты, которые переносят аминную группу (NH_2) аминокислоты на кетокислоту. Среди многочисленных трансаминаз клиническое значение имеют две: глутаминощавелевоуксусная — аспартат-аминотрансфераза (GOT) и глутамино-пировиноградная — аланин-аминотрансфераза (GPT).

Трансаминазы распространены в животном и растительном мире. У людей наибольшая концентрация GOT отмечается в мышце сердца, затем в печени, поперечнополосатых мышцах и в почках. В физиологических условиях у людей активность GOT в сыворотке равна 4—40 единицам, в среднем 22 единицы, а GPT 5—30 единиц, в среднем 16 единиц. Трансаминазы выделяются с жел-

чью, как и фосфатазы, концентрация ферментов в желчи является высокой, в противоположность концентрации их в моче, в которой они находятся в небольшом количестве.

La Due, Wróblewski и Karmen (83) в 1954 г сообщили об увеличении активности GOT в сыворотке при инфаркте миокарда в границах от 100 до 6000 единиц. У одного из их больных активность GOT, определенная через 3 часа после появления болей, была еще нормальной, а через 12 часов после начала болей равнялась уже 500 единицам. Повышенная активность трансаминазы возвращалась к норме в случаях, о которых пишут авторы, между 3—6 днями.

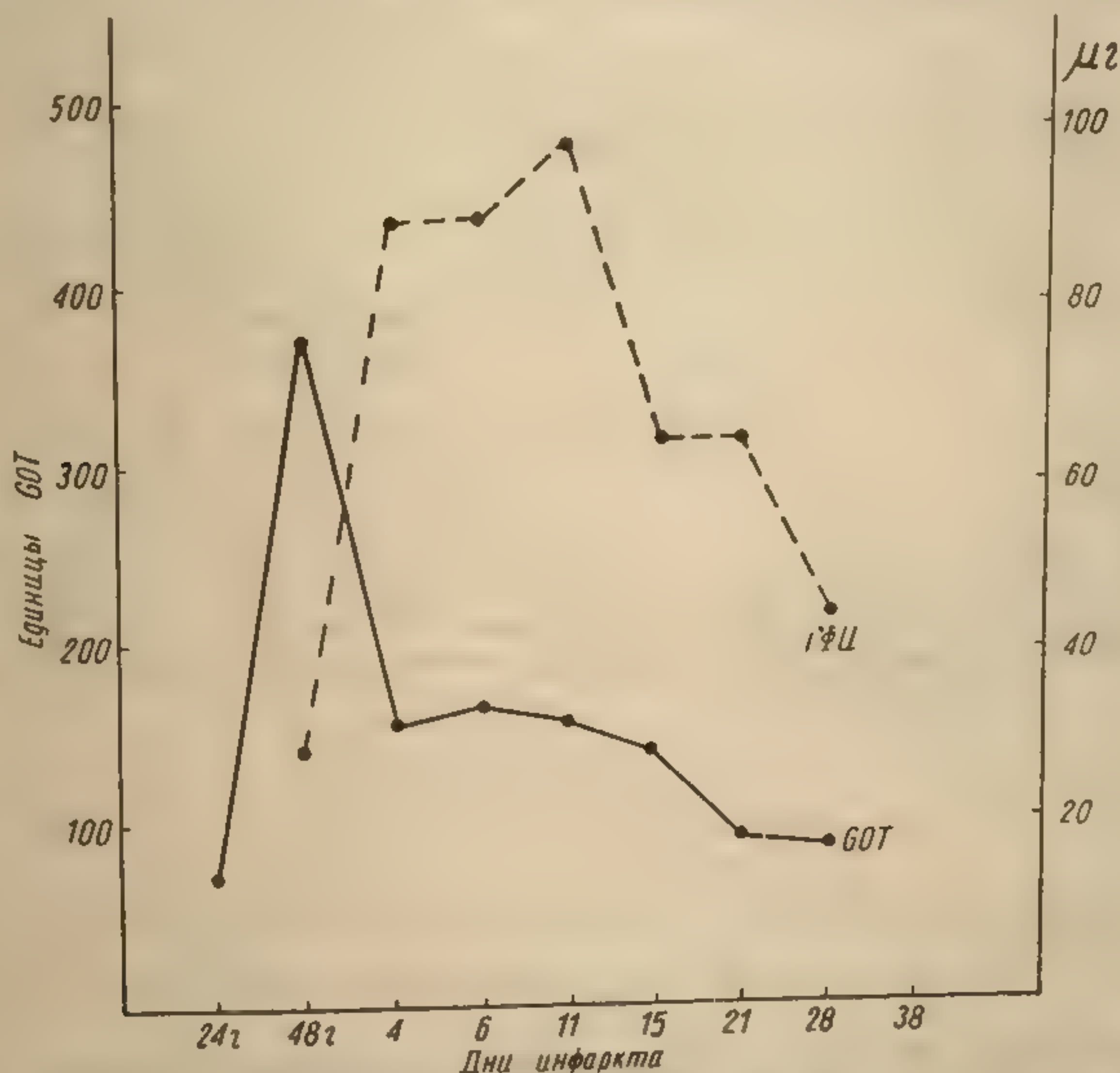


Рис. 39. Активность трансаминазы (GOT) и фосфогексоизомеразы (ФГИ) при инфаркте передней и задней стенки сердца.

Согласно Chinsky и сотрудникам (21, 22), значительное повышение активности GOT при инфаркте отмечается уже через 6 часов и достигает вершины через 24 часа. Эти данные подтвердили многие иностранные авторы, а из польских Gibiński и Kokot (45, 46), Żera, Hoffman и сотрудники (152), Dyczkowska из нашей клиники.

Согласно данным нашей клиники в типичных случаях острого инфаркта миокарда активность GOT в сыворотке увеличивается уже через 6 часов, достигает максимума через 24—48 часов от начала болей, и возвращается к норме на 5—6 день.

Концентрация ферментов сыворотки при инфаркте миокарда зависит от величины инфаркта — как следует из экспериментальных исследований на животных (82, 93, 2). О том же свидетельствуют клинические наблюдения, согласно которым, чем выше активность ферментов, тем хуже прогноз и боль-

ше летальность, которая при высокой активности доходит до 50% (21, 22, 98). Согласно данным других авторов, активность GOT у больных, которые пережили инфаркт миокарда, в среднем равнялась 114 единицам, а у больных, которые умерли от инфаркта — в среднем 212 единиц. Среди больных, у которых активность фермента равнялась 300 единицам, никто не выжил (1). Итак, величина роста активности ферментов связана с тяжестью инфаркта и влияет на прогностическую оценку случая.

Из многочисленных клинических наблюдений как и из наших собственных, следует, что вторичное увеличение активности ферментов в течение заболевания свидетельствует о новом некротическом очаге в сердечной мышце, то есть о расширении очага инфаркта или о новом инфаркте. Чаще всего

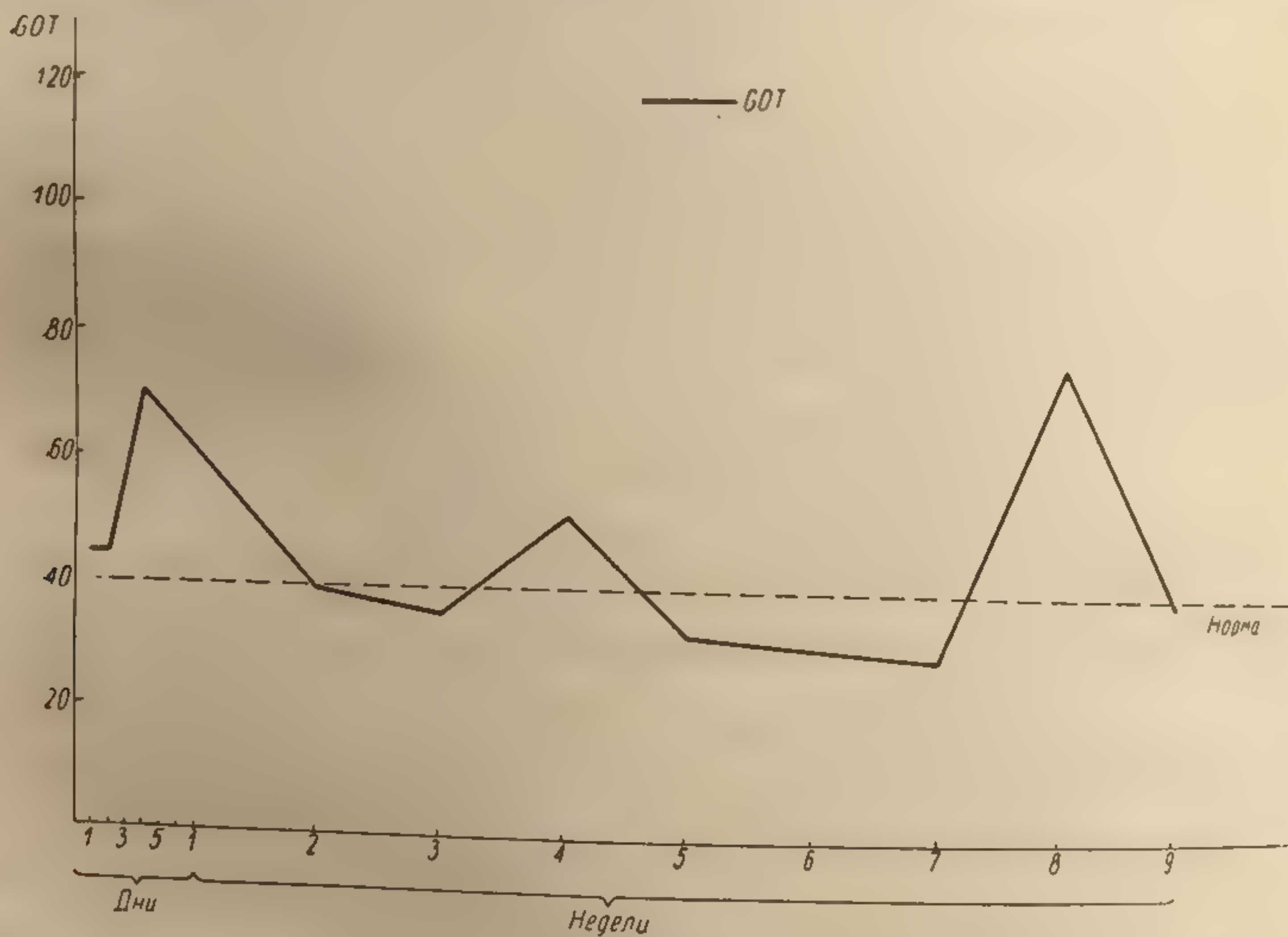


Рис. 40. Повышение активности GOT при первичном и вторичном инфаркте миокарда с интервалом в 2 месяца у больного 50 лет.

вторичный рост активности ферментов совпадает с новыми сильными коронарными болями или дополнительными электрокардиографическими данными, указывающими на свежие очаги. Если вторичному увеличению активности ферментов даже не соответствуют новые боли или новые электрокардиографические данные, то тем не менее оно может свидетельствовать о свежем некротическом очаге. Периодические анализы ферментативной активности при инфаркте миокарда могут дать ценную диагностическую информацию, которую не удастся получить другими методами. При тяжелом инфаркте миокарда с длительным течением, повторные увеличения активности ферментов могут указывать на многократное появление мелких некротических очагов в сердечной мышце.

Увеличение активности GOT имеет место в 95—100% случаев инфаркта миокарда. Многочисленные клинические и секционные наблюдения указывают на полное соответствие между биохимическим диагнозом инфаркта

миокарда и аутоптическими данными (98, 52). Согласно Орлову и сотрудникам, La Due и Wróblewski, в той же серии случаев было 15% ложно отрицательных и 40% ложно положительных клиническо-электрокардиографических диагнозов.

Как уже было сказано выше, увеличение активности GOT отмечается только в случаях клеточного некроза. Доказательством этого, между прочим, служат также экспериментальные данные, полученные на животных, которые показали, что по мере увеличения концентрации фермента в сыворотке, уменьшается его концентрация в некротизированной части сердечной мышцы. Это указывает на переход фермента из пораженной сердечной мышцы в сыворотку. Поэтому при острой коронарной недостаточности без инфаркта

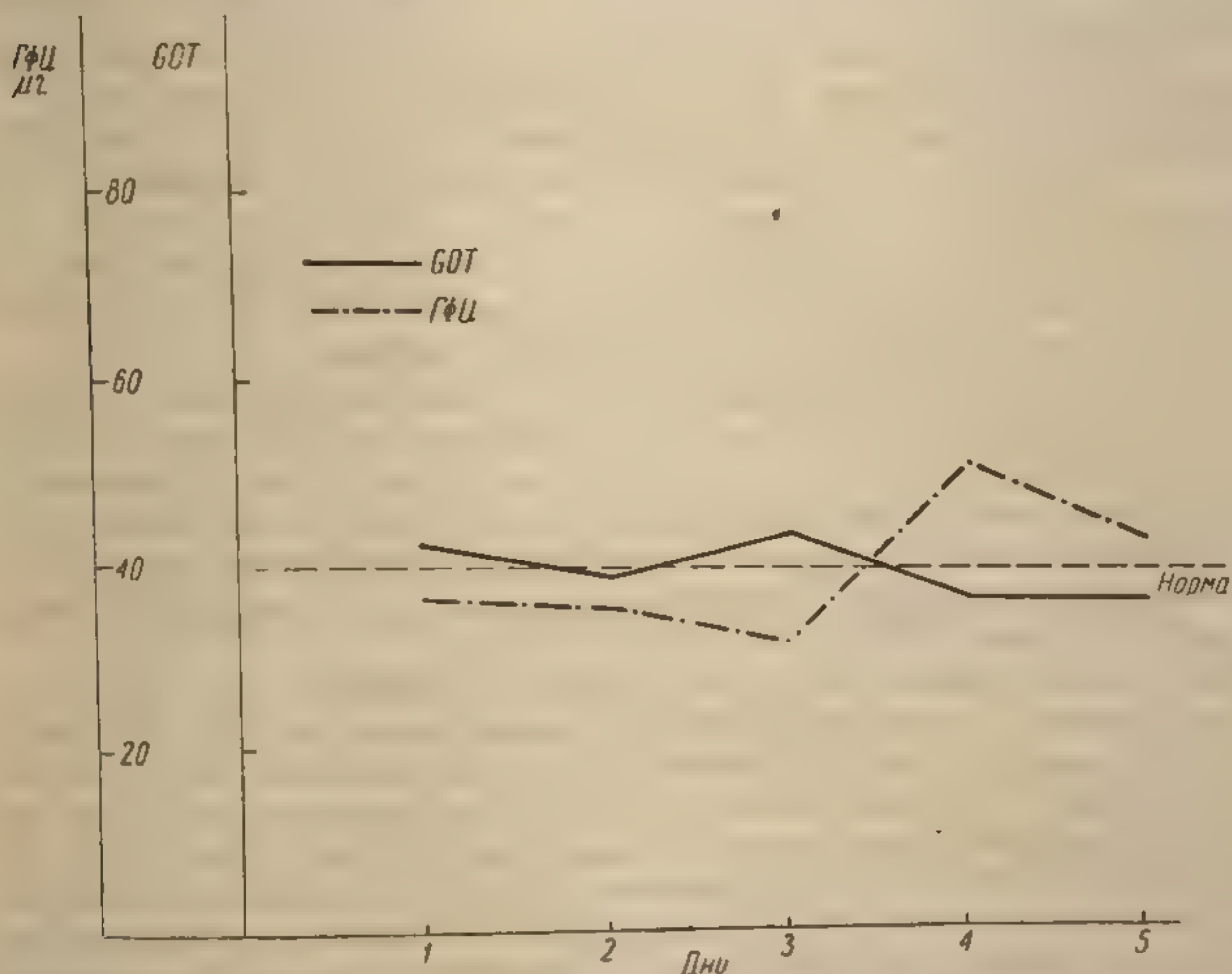


Рис. 41. GOT и ФГИ при острой коронарной недостаточности без инфаркта.

активность GOT остается нормальной. Тем не менее, в некоторых случаях, о чем сообщает также Gibiński (48), при острой коронарной недостаточности можно иногда обнаружить увеличение активности GOT, несмотря на отсутствие признаков инфаркта, и, особенно, электрокардиографических данных. Такие изменения активности фермента могут свидетельствовать об образовании мелких некротических очагов (так называемых микроинфарктов), не дающих заметных электрокардиографических нарушений.

Как при острой коронарной недостаточности, без инфаркта, так и при стенокардии, отмечается нормальная активность GOT. Однако, согласно данным многих авторов, в некоторых случаях длительных стенокардических болей активность ферментов может быть несколько повышенной (82, 93, 21, 22). Это может свидетельствовать об образующемся инфаркте, или же может зависеть от мелких некротических очагов, которые могут возникнуть в некоторых тяжелых случаях стенокардии.

Наконец следует напомнить, что кроме некроза, также острая гипоксия может являться причиной освобождения фермента и персхода его в сыровотку крови. На это указывают данные американских авторов (смотри ниже). При дифференциальном диагнозе следует иметь в виду следующие заболевания:

При перикардитах может появиться гипертрансаминемия, которая свидетельствует о некротических изменениях в субперикардиальной части сердечной мышцы. Из 16 больных с перикаритом, в 14 случаях активность GOT была нормальной, у оставшихся двух больных увеличение активности вероятно зависело от сопутствующего поражения печени (82).

В некоторых случаях *tachyarhythmia perpetua* отмечается незначительное увеличение GOT, которое может быть почечного или сердечного происхождения (21, 22).

При ревматическом перикардите — *pericarditis rheumatica* — в 50% случаев также отмечается увеличение ферментной активности (смотри ниже).

При компенсированных пороках сердца активность GOT является нормальной. При декомпенсации кровообращения активность ферментов может увеличиваться вследствие повреждения печени, вызванного застоем.

Легочная эмболия в отдельных случаях может вызвать незначительное увеличение активности GOT. Это имеет место на 4—6 день заболевания, когда активность GOT при инфаркте миокарда уменьшается.

Значительное увеличение активности GOT отмечается при остром панкреатите, при котором одновременно резко увеличивается активность амилазы (диастазы), что следует иметь в виду при дифференциальном диагнозе.

При заболеваниях печени, особенно остром гепатите и токсическом поражении печени, активность трансаминазы иногда резко повышается, особенно GPT, в отличие от инфаркта миокарда, при котором более значительно повышается активность GOT.

Повышение активности GPT при инфаркте миокарда встречается лишь в случаях большого инфаркта. Иначе протекает также рост ферментативной активности сыворотки при гепатитах; так рост активности трансаминазы отмечается еще перед увеличением уровня билирубина, и держится на высоком уровне в течение двух недель и даже больше.

Увеличение активности трансаминазы отмечается также при очаговых изменениях в мозгу, мышечных травмах (Crush-Syndrom) при прогрессивной мышечной дистрофии, гангрене, после частых хирургических вмешательств.

Лактатдегидрогеназа катализирует реакцию перехода пировиноградной кислоты в молочную. Она находится в почках, скелетных мышцах, печени, сердечной мышце, а также в опухолевой ткани. В физиологических условиях активность фермента в среднем равна 440 единицам (200—680 единиц по Wróblewski). Колебания у одного и того же человека доходят до 30%.

Wróblewski и сотрудники (150) в 1955 году обнаружили увеличение активности лактатдегидрогеназы при остром инфаркте миокарда, когда активность ее доходила до 2600 единиц и больше. Активность увеличивалась в течение 2 дней от момента возникновения инфаркта и оставалась высокой примерно 5—6 дней, как и повышенная активность трансаминазы.

В отличие от данных Wróblewski и сотрудников, Amelung и Horn (14), а также и другие, установили, что нормализация активности лактатдегидрогеназы наступает лишь через 1—2 недели, то есть значительно позже, чем GOT. Поэтому некоторые авторы считают, что определение активности этого фермента дает больше данных, чем анализ GOT, особенно в более позднем периоде инфаркта, то есть между первой и второй неделей, когда активность GOT уже вернулась к норме.

Увеличение активности лактатдегидрогеназы отмечается после хирургических операций на сердце (*valvulotomia*), как и увеличение активности GOT, которое наступает через 4 часа после операции и держится до 10 дней. Из других заболеваний, при которых отмечается повышенная активность фермента, следует назвать острые и хронические лейкозы, опухоли, гепатиты, прогрессирующую мышечную дистрофию.

Повышения активности фермента не отмечается при коронарной недостаточности, при ревматизме, инфаркте легкого.

Альдолаза принимает участие в бескислородной фазе обмена глюкозы, расщепляя фруктозо-1,6-дифосфорный эфир (ФДФ), до фосфоглицероальдегида и фосфодиоксиацетона. Она находится главным образом в мышечной ткани и печени, но есть также и в других клетках организма. Активность фермента сыворотки в норме равна 3—8 единицам, в среднем 5,4 единицам.

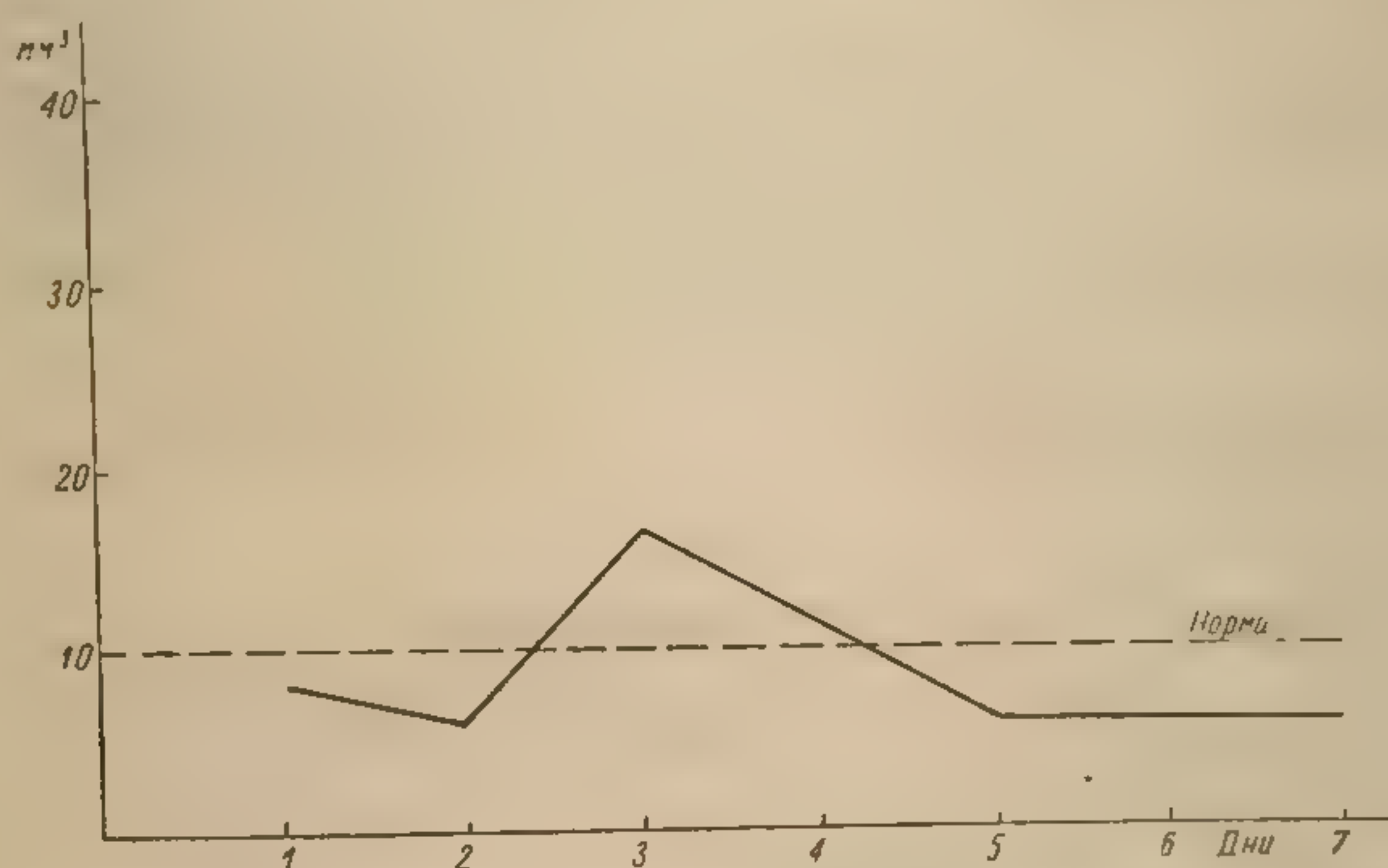


Рис. 42. Активность альдолазы у больного В. З. 50 лет (инфаркт передней стенки).

При остром инфаркте миокарда активность альдолазы увеличивается и достигает своей вершины в течение 12—48 часов, нормализуется на 5 день (117, 157).

Польские авторы (152) наблюдали рост активности альдолазы несколько позже, чем трансаминазы (в среднем через 12—24 часа). Эта активность росла медленнее и возвращалась к норме на 3 суток. Активность альдолазы увеличивается до 14—60 единиц, в среднем до 40 единиц. Согласно принятым в настоящее время взглядам, определение активности альдолазы при инфаркте миокарда является менее чувствительным тестом, чем определение GOT. Эта проба иногда может дать отрицательный результат в тех случаях, при которых активность GOT увеличена.

При острой коронарной недостаточности без инфаркта миокарда активность альдолазы остается нормальной. Активность альдолазы повышается, кроме того, при остром гепатите и, в меньшей степени, при других хронических заболеваниях печени, при раке предстательной железы и многих других заболеваниях.

Холинэстераза является ферментом, который разлагает ацетилхолин на холин и уксусную кислоту, а также гидролизует холиновые эфиры. Из двух видов ферментов, которые имеются в сыворотке, псевдохолинэстераза

образуется в печени; ее можно обнаружить во всех тканях организма. Нормальная величина холинэстеразы в среднем равна $1,190 \text{ мм}^3 \text{ CO}_2$, то есть $1,119 \text{ мм}^3 \text{ CO}_2 \pm 0,153$ согласно газометрическому способу R. Амонна. При инфаркте миокарда активность холинэстеразы снижается, падая до минимума между 5—7 днями от начала инфаркта (62, 91, 94), после чего постепенно возвращается к норме. Если уровень фермента остается низким более длительное время, то это служит плохим прогностическим симптомом.

Трудно объяснить, почему активность фермента при инфаркте миокарда снижается. Heinesker и сотрудники считают, что это происходит в результате освобождения из некротической ткани ингибиторов типа гистамина. Влияние оказывает также наступающая после инфаркта гипотония с преобладанием влияния парасимпатической нервной системы.

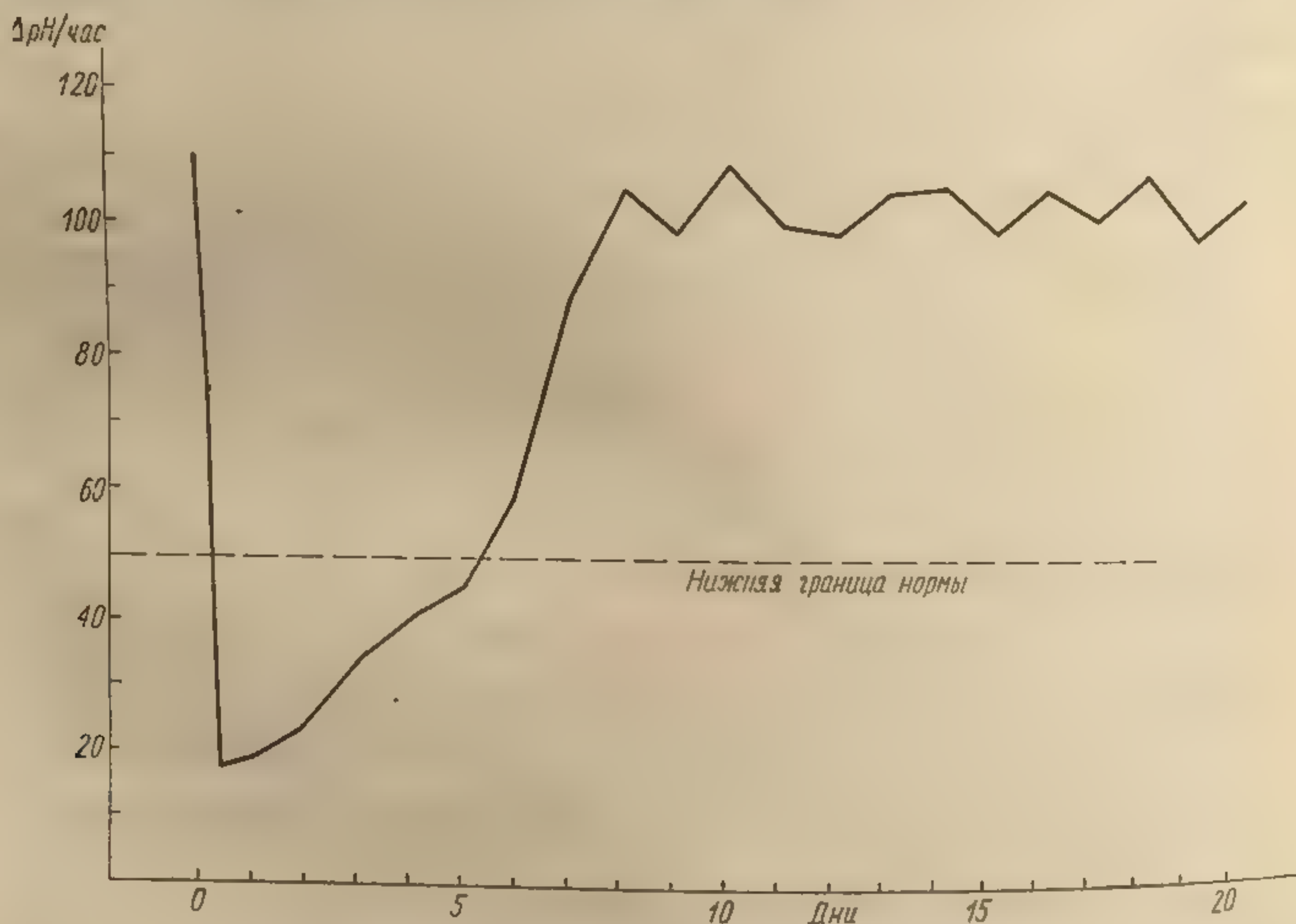


Рис. 43. Активность холинэстеразы при инфаркте миокарда.

Активность холинэстеразы снижается также при заболеваниях печени, при некоторых инфекционных заболеваниях, опухолях, дистрофии и других. Активность холинэстеразы тормозят также некоторые лекарственные вещества, как хинидин и амид прокаина.

Уропепсин происходит из главных клеток слизистой оболочки желудка, откуда в количестве 1% он проникает в кровь, а остальные 99% выделяются в полость желудка. С мочой в течение 1 часа выделяется 19,6—50 единиц уропепсина, в среднем 34,8 единиц при определении методикой Sylwestra в модификации Westa и сотрудников.

При инфаркте миокарда отмечается 2—4-кратное увеличение уровня уропепсина в первые дни заболевания (74). Согласно Kędra и Markiewicz (71) в первые три дня острого инфаркта миокарда отмечается 2—5-кратное увеличение уровня уропепсина, который затем, около 9 дня, падает до верхней границы нормы и на этом уровне остается в течение 4—6 недель.

В случаях, осложненных, например, отеком легких, желудочковой тахикардией, а также при рецидиве коронарных болей, уровень уропепсина вто-

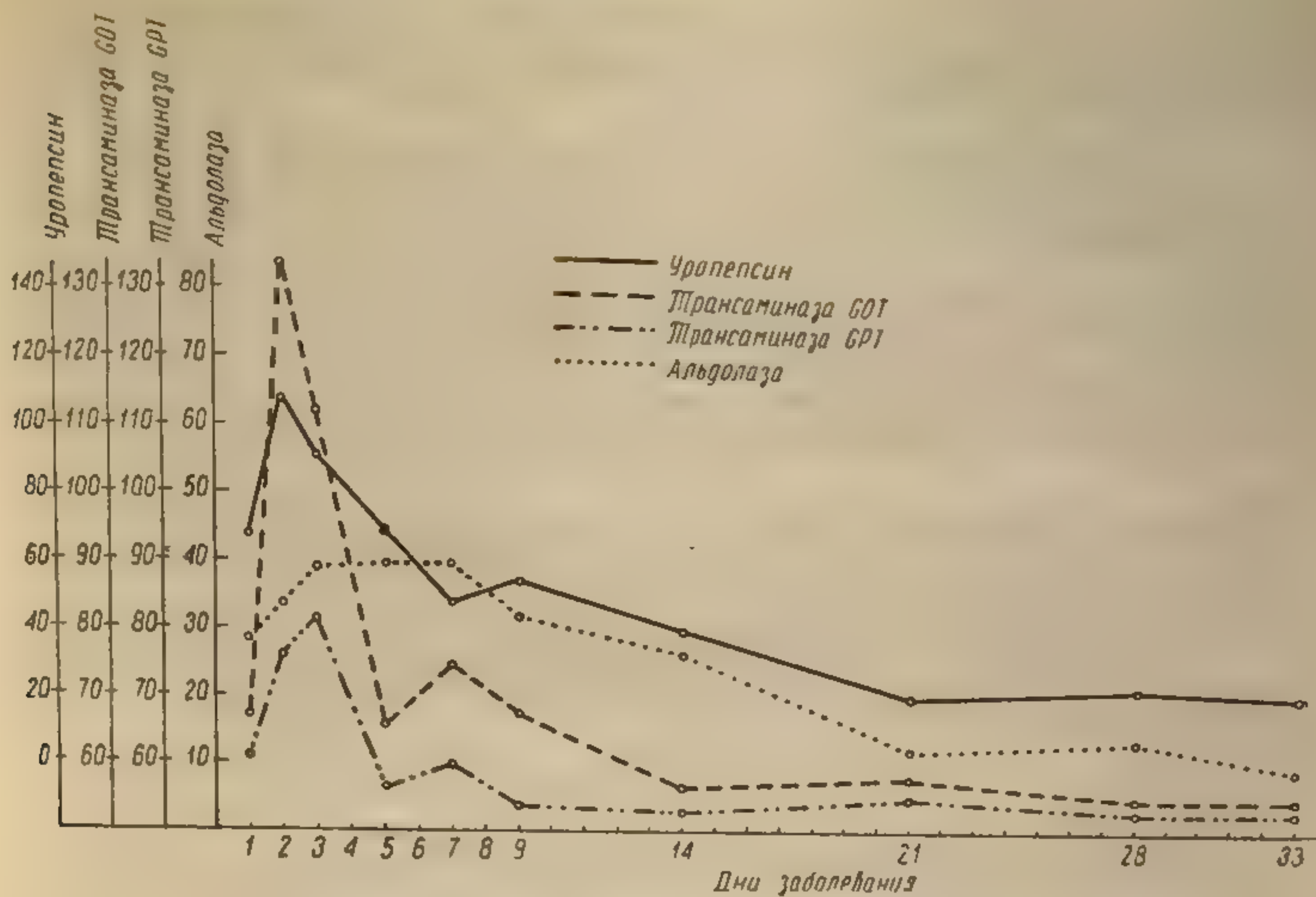


Рис. 44. Уропепсин и другие ферменты при инфаркте миокарда (Kedra).

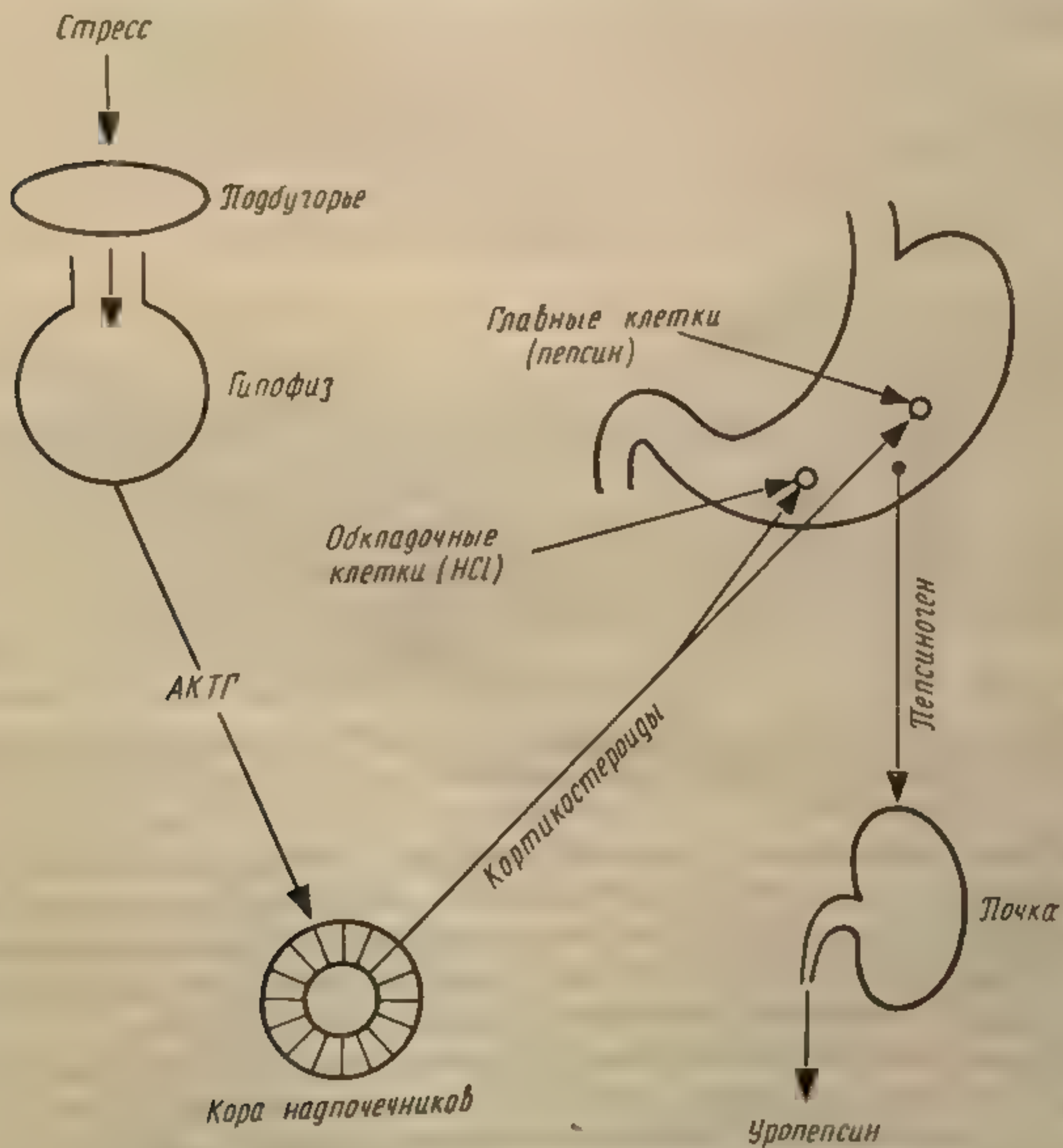


Рис. 45. Влияние стресса на выделение пепсиногена.

рично увеличивается. Между уровнем уропепсина и уровнем GOT и альдолазы существует параллелизм. При стенокардии уровень уропепсина не повышается.

Реакция эта при инфаркте миокарда является выражением стресса. Под влиянием стресса происходит раздражение гипоталамуса, затем по пути гипофиз — кора надпочечников наступает раздражение главных клеток слизистой оболочки желудка и усиленное выделение пепсина и соляной кислоты. Это неспецифическая реакция, не зависящая от распада клеток при инфаркте. При атрофии слизистой оболочки желудка и отсутствии выделения пепсина нет и уропепсина. Так, в двух случаях массивного инфаркта, в которых в желудочном содержимом не было соляной кислоты, не обнаружено и уропепсина.

Увеличенное выделение уропепсина, кроме инфаркта миокарда, имеет место в тех случаях, когда под влиянием стресса увеличивается продукция глюкокортикостероидов и наступает усиленная экскреция желудочного сока.

Глюкозофосфат-изомераза принимает участие в бескислородной фазе обмена глюкозы, катализируя обмен глюкозо-6-фосфатного эфира в фруктозо-6-фосфатный эфир.

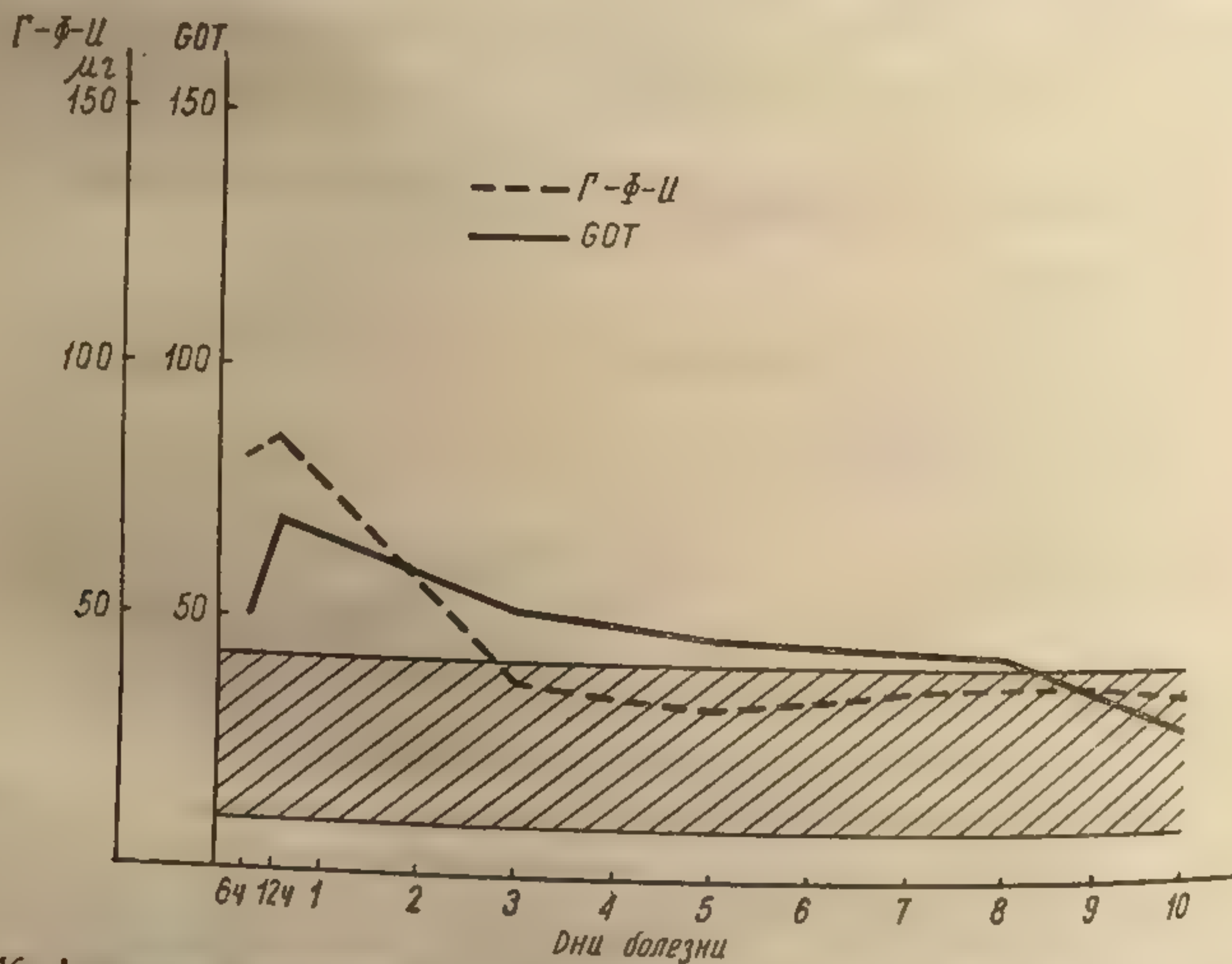


Рис. 46. Активность глюкозофосфат-изомеразы и GOT при инфаркте передней стенки (Dyczkowska, III Клиника Внутренних Болезней — Вроцлав, 161).

Этот фермент находится в печени, мышцах, почках, костях и так далее. В физиологических условиях активность его равна 8—40 единицам Bodansky.

При инфаркте миокарда активность глюкозофосфат-изомеразы в сыворотке увеличивается и достигает своего максимума через 24 часа от начала инфаркта. Затем в течение 5—6 дней она снижается (17).

Исследованиями в нашей клинике установлено, что повышение активности этого фермента при инфаркте миокарда начинается через 3 часа от начала болезни и длится до 6 дней. Активность фермента падает до нормы примерно через 12 дней от развития инфаркта (Dyczkowska).

Повышение активности фермента при инфаркте миокарда может являться результатом гипоксии, которая приводит к увеличению проницаемости клеточной оболочки и освобождению фермента. Экспериментальными исследованиями на животных установлено, что фермент происходит из поврежденных при отравлении четыреххлористым углеродом, увеличивалась активность глюкозофосфат-изомеразы в сыворотке.

Активность фермента увеличивается при инфекционном гепатите, механической желтухе и при метастазах опухолей.

Серотонин. В связи с образованием тромба и распадом тромбоцитов освобождается 5-окситриптами (серотонин), 40% которого выделяется с мочой в виде 5-оксииндолуксусной кислоты (HIA).

Angelino и сотрудники (3) применили методику Udenfried и сотрудников для определения 5-оксииндолуксусной кислоты в раннем периоде инфаркта миокарда, и обнаружили увеличенное выделение ее с мочой. В физиологических условиях с мочой выделяется от 200 до 500 γ кислоты на 100 мл мочи, тогда, как при инфаркте миокарда это количество увеличивалось от 900 γ /100 мл до 3000 γ /100 мл. В некоторых случаях увеличенное выделение 5-оксииндолуксусной кислоты с мочой отмечалось сразу же после начала болей, когда ферменты сыворотки крови не обнаруживали еще отклонения от нормы, а ЭКГ показывала лишь признаки ишемии. В случаях клинически выраженного прогресса некротических изменений, уровень 5-оксииндолуксусной кислоты оставался повышенным. У больных же с благоприятным течением заболевания уровень этой кислоты снижался до нормы в течение 48—72 часов. В случаях увеличения очага некроза в виду прогрессирующего некроза, отмечались повторные увеличения уровня кислоты.

Эта проба не является специфической, так как усиленное выделение 5-оксииндолуксусной кислоты с мочой отмечалось при карциноидах, некоторых энцефалопатиях, тромбозах, легочных эмболиях, приступах бронхиальной астмы, и даже после введения резерпина и употребления в пищу бананов.

Гистамин. Увеличение уровня гистамина в крови при инфарктах миокарда отмечается уже в первые часы после появления болей (133, 135, 137). Уровень гистамина увеличивается в течение первого часа от начала болей, иногда даже через 30 минут, и достигает вершины через 3 часа, после чего постепенно снижается, достигая нормальных значений к 9 дню. Иногда уровень гистамина держится на максимальных цифрах в течение 12 часов. В случаях, которые кончаются летально в первые дни инфаркта (инфаркт с шоком), повышенный уровень гистамина не снижается и достигает максимальной величины перед смертью.

В сравнении с гистаминемией, активность GOT начинает нарастать через 6 часов от начала болей и длится 4 дня, достигая нормального уровня на 4—7 день. Даже активность глюкозофосфат-изомеразы, уровень которой начинает расти через 3 часа после появления болей, опаздывает по сравнению с ростом уровня гистамина. Между изменением уровня гистамина и перечисленных ферментов, параллелизма не отмечается.

При острой коронарной недостаточности без инфаркта миокарда отмечается незначительное повышение уровня гистамина в крови, в зависимости от болей. Небольшое увеличение уровня гистамина в крови можно обнаружить у больных с симптомами тяжелой стенокардии в периоде коронарных болей.

Можно по-разному объяснять увеличение уровня гистамина в крови при инфаркте миокарда. Считается, что в первые три часа после начала инфаркта,

резкий рост гистамина в крови может быть вызван болевым шоком или острой гипоксией. Эти факторы вызывают освобождение гистамина. Уровень гистамина может оставаться высоким и позже, после 3 часов, но не таким высоким, как раньше, что вызвано освобождением гистамина из распавшихся клеток, а также расстройствами окисления с последующими нарушениями метаболизма гистамина.

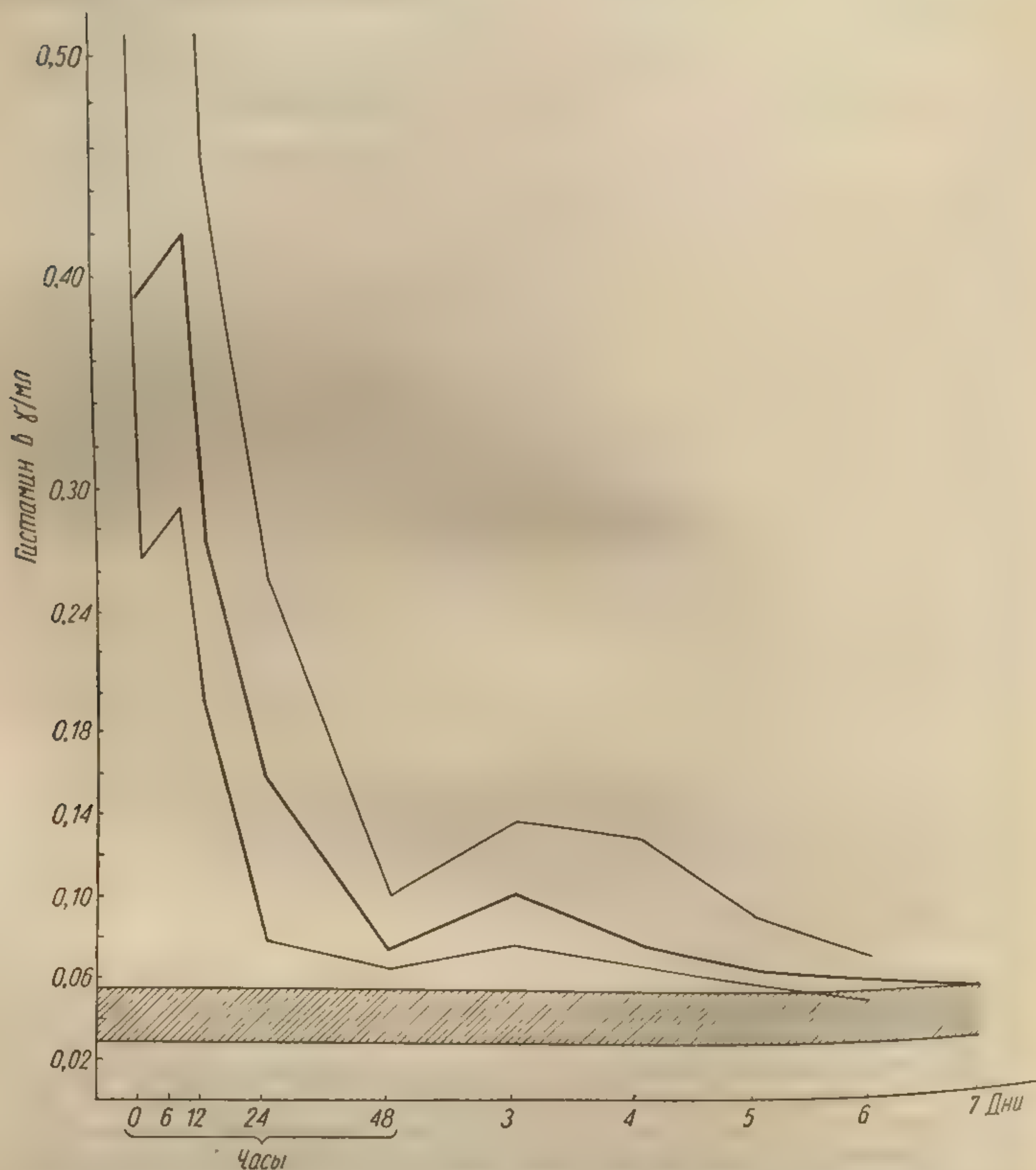


Рис. 47. Изменение содержания гистамина в крови при инфаркте миокарда, закончившемся выздоровлением (Е. Szczeklik, J. Naro, A. Janiakowa и сотрудники).

В последнее время в ферментативную диагностику инфаркта миокарда введено исследование креатинкиназы. Креатинкиназа является специфическим ферментом поперечно-полосатых мышц. В физиологических условиях она имеется в сыворотке в количествах, которые иногда находятся на гра-

нище определения. Верхняя граница нормы в сыворотке крови не превышает $2,7 \mu\text{M}/\text{мин. на } 1000 \text{ мл}$ при 37°C .

При инфаркте миокарда отмечается рост активности фермента, уже через 6 часов от начала заболевания, достигающий максимальной величины через 24—36 часов. Через 3—4 дня активность фермента возвращается к норме. Так, увеличение активности креатинкиназы наступает почти одновременно

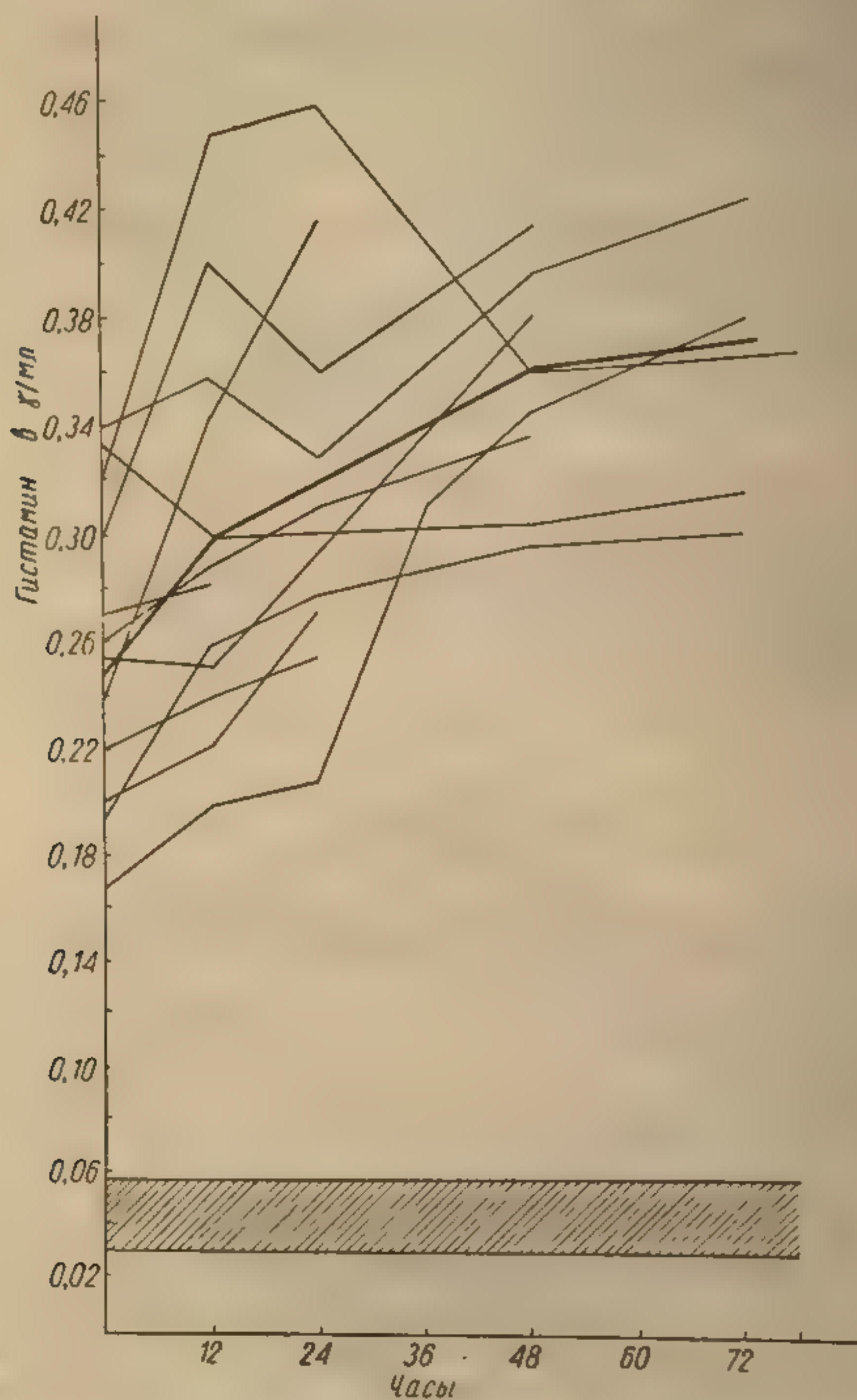


Рис. 48. Изменение содержания гистамина в крови при инфаркте миокарда со смертельным исходом (E. Szczeklik, J. Hano, A. Janiakowa).¹

с увеличением активности GOT, однако раньше возвращается к норме. Исследование активности креатинкиназы не дает специальных данных в сравнении с определением GOT, и лишь при инфаркте легкого может иметь дифференциально-диагностическое значение. При инфаркте легкого уровень ее не повышается, тогда как активность GOT увеличивается. При стенокардии количество креатинкиназы остается в норме.

Увеличение активности креатинкиназы имеет место при прогрессивной мышечной дистрофии и полимиозите (158, 159, 160).

Таблица 12

	Активность (величина)					Причины изменения активности (величины)
	нормальная	приинфаркте миокарда	начало роста	вершина	нормализация	
GOT	22е (5—40е.)	> 300е.	6 h	24 h	3—6 дней	некроз
Альдолаза	(3—8е.) в среднем 5е.	(14—60е.) в среднем 40е.	12—24h	24—48h	3—5 дней	некроз
Лактатдегидрогеназа	440е. (200—580е.)	> 2600е.	48h	—	7—14 дней	некроз
Фосфогексоизомераз	8—40μ	в среднем 100μг (50—200μ)	3h	24h	6—12 дней	некроз гипоксия сердечной мышцы
Холестериназа	1,119 см ³ CO ₂	—	—	5—7 дней минимальное количес.	—	ингибция из некротических тканей
Уропепсин	34,8 ед/ч. 19,6—50 ед/час	2—5-кратное увеличение	24—72h	—	9 дней	стресс
Гистамин	0,045 γ/мл 0,032— 0,050 γ/мл	> 0,42 γ/мл	30'—60'	3—12h	9 дней	стресс некроз
Метаболиты серотонина ГИУ	200—500 γ/100 см ³	900—3000 γ/100 см ³	в первые минуты	—	48—72 часов	освобождение из тромбоцитов

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abderhalden R.*: Klinische Enzymologie. G. Thieme Verlag Stuttgart 1958. — 2. *Aleksandrow D.*: Współczesne kierunki badań nad patogenezą miażdżycy. P. A. M. W. 29, 1029, 1959. — 3. *Angelino P. F., Crolle C., Pellergrini A., Tartara D., Passegio A. M., Pagano P. G.*: Presse Med. 69, 728, 1961. — 4. *Amellung D., Horn H. D.*: Dtsch. med. Wschr. 81, 1701, 1956. — 5. *Balo J., Bango I.*: Bioch. J. 46, 384, 1950. — 6. *Benson E. S.*: Circulation Research 3, 221, 195. — 7. *Benson E. S., Freier E. E., Hallaway B. E., Johnson M. J.*: Am. J. Phys. 187, 483, 1957. — 8. *Benard H., Gajdos A., Gajdos-Torok*: Porphyrines, Paris, 1958, Bailliere, J. — 9. *Biggs R., Macfarlane R. G.*: Human Blood Coagulation and its Disorders Oxford, 1957. — 10. *Bing R. J.*: J. Amer. Med. Ass. 164, 647, 1957. — 11. *Bing R. J.*: The relationship between biochemical activity and mechanical function of the heart. Enzyme regulations in clinical medicine. B. Schwabe et Co. Basel Stuttgart 1961. — 12. *Bing R. J.*: Ueber den Stoffwechsel des intakten Herzens. Verhandl. deutsch Gesellschaft f. Kreislaufforsch. D. Steinkopf Verlag Darmstadt 1961. — 13. *Bing R. J.*: Bull. New York Med. 27, 407, 1951. — 14. *Bjorck G., Axen O., Thorson A.*: Am. Heart. J. 44, 143, 1952. — 15. *Brod J.* и соавт.: Hypertensivni choroba A. Z. N.; Praha 1954. — 16. *Bolo J., Bango I.*: Acta physiol. Acad. scient. Hungariae 4, 187, 1953. — 17. *Burn J. H., Aunning A. J., Walker J. M.*: Circulation Res; 4, 288, 1956. — 18. *Burgen A. S. V., Terraux K. G.*: J. Physiol. 120, 449, 1953. — 19. *Cali A., Rossi G. B.*: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague 1961. — 20. *Cecil R. L., Loeb R. F.*: The Textbook of Medicine, Philadelphia 1959. — 21. *Chinsky M., Schmagranoff C. L., Sherry S. J.*: Laborat. Clin. Med. 47, 108, 1956. — 22. *Chinsky M., Wolff R. J., Sherry S.*: Am. J. Med. Sc. 233, 400, 1957. — 23. *Ciesielski L.*: Pol. Tyg. Lek. 16, 144, 1961. — 24. *Ciswicka M., Sznajderman M.*: PTL. 13, 86, 1958. — 25. *Ciswicka M., Sznajderman M.*: PTL. 11, 2145, 1956. — 26. *Cori C. F.*: Regulation of enzymes activity in muscle during work in Enzymes — Units of Biological Structure and Function. Henry Ford Hospital Symposium Acad. Press. Inc. 1956. — 27. *Cori G. T., Illingworth D.*: Biochem. biophys. Acta 21, 105, 1956. — 28. *Cori G. T., Cori C. F.*: J. Biol. chem. 116, 119, 1936. — 29. *Duguid J. B.*: Practitioner 241, 175, 1955. — 30. *Danfort W. M., Ballard F. B., Kako K., Choudhury and Bing R. J.*: Metabolism of the Heart in Failure. Circulation 21, 112, 1960. — 31. *De Ritis F., Coltorti M., Ginotti G.*: Science 124, 32, 1956. — 32. *Edwards W. S., Siegel A. and Bing R. J.*: J. Clin. Investig 33, 1646, 1954. — 33. *Fawaz G., Hawe E. S. and Tutunyi B.*

Brit. J. Pharmacol. 12, 270, 1957. — 34. Fleckenstein A. Enzymregulation in Herzstoffwechsel. Enzymatische Regulationen in der Klinik B. Schwabe, Basel Stuttgart 1961. — 35. Fleckenstein A., Janke J., Gerlach E.: Klin. Wschr. 37, 451, 1959. — 36. Floyer M. A.: Ciba Fondation Symposium on Hypertension Churchill, London 155, 1954. — 37. Frick P. G.: Schweiz. Med. Wschr. 91, 1245, 1961. — 38. Gajewski J.: PAMW 29, 613, 1957. — 39. Gepner-Wisniewska A. PAMW 27, 1183, 1957. — 40. Gegerly J.: Muscle proteins and energy utilisation. Ann. New York Acad. Sc. 72, 538, 1959.

41. Genest J., Koiz E., Nowaczyński W. and Leboeuf G.: Proc. Soc. exp. Biol. N. Y. 97, 676, 1958. — 42. Герасимова Е. Н.: Терапевтический архив 12, 34, 1960. — 43. Gibiński K., Gonciarz Z.: PAMW, 30, 21, 1960. — 44. Gibiński K., Gonciarz Z.: PAMW, 31, 161, 1961. — 45. Gibiński K., Kokot T.: PTL, 12, 1381, 1957. — 46. Gibiński K., Kokot T.: PTL, 12, 1290, 1957. — 47. Gibiński K., Nowak A.: PAMW, 31, 309, 1961. — 48. Gibiński K.: PTL, 13, 821, 1958. — 49. Gibiński K.: PTL, 16, 781, 1961. — 50. Gero S., Gergeby J., Devenyi T., Virag S., Szekely J., Jakab L.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague 1961.

51. Goldblatt H., Lynek J., Hanzal R. F.: J. exp. Med. 59, 347, 1934. — 52. Goldblatt H.: Circulation 21, 643, 1960. — 53. Goodale W. T., Hakel D. B.: Circul. Res. 1, 511, 1953. — 54. Goldberger E.: Pathogenesis of Essential Hypertension. The Am. Journal of Cardiology I, 155, 1958. — 55. Gore J.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague, 1961. — 56. Gruszecki L., Januszkiewicz L. PAMW, 31, 797, 1961. — 57. Hanson A., Biorck G.: Acta med. Scand. 157, 493, 1957. — 58. Harakal C. D., Collins D. A.: Circulat. Res. 4, 612, 1956. — 59. Harris E. J., Hutter O. F.: J. Physiol. 33, 58, 1956. — 60. Hasellbach W.: Kontraktile Strukturen des Herzmuskels und Kontraktionszyklus. Verhandl. d. deutsch. Gesellschaft f. Kreilaufforsch. D. Steinkopf Verlag Darmstadt 1961.

61. Hegglin R.: Klinische Probleme des Myokardstoffwechsels. Verh. d. deutsch Gesellschaft für Kreilaufforsch. Darmstadt 1961. — 62. Heinecker R., Mayer I.: Klin. Wschr. 35, 340, 1957. — 63. Heymans C.: Congrès International d'Angéiologie, Prague 1961. — 64. Heuschler D., Reich E.: Klin. Wschr. 37, 716, 1959. — 65. Ignatowska H.: PAMW, 29, 629, 1959. — 66. Janiakowa A.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague 1961. — 67. Kako K. and Bing R. J.: Contractility of actomyosin bands prepared from normal and failing human hearts. J. Clin. Invest. 37, 465, 1958. — 68. Kardasiewicz St., Masny N.: PTL, 16, 165, 1961. — 69. Karmen A., Wróblewski F. and La Due J.: J. Clin. Invest. 34, 126, 1955. — 70. Keller N., Pfister H.: Ztschr. f. inn. Med. 10, 735, 1/55.

71. Kędra M., Markiewicz H.: PAMW, 39, 1479, 1959. — 72. King J., Wainol A. B.: Br. Med. J. 5, 1361, 1960. — 73. Kittinger G. W., Wexler B. C., Miller B. F.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague 1961. — 74. Kamenik A.: PTL, 13, 381, 1958. — 75. Kopeć M.: PAMW, 27, 1197, 1957. — 76. Kopeć и соавт.: PTL, 16, 13, 1961. — 77. Krawczyński J.: Post. Biol. 1, 87, 1959. — 78. Koller F.: Schweiz. Med. Wschr. 90, 44, 1960. — 79. Kukowetz W. R., Hess M. E., Schanfeld J. and Hangaard N.: J. Pharmacol. exp. Ther. 127, 122, 1959. — 80. Kwoczyński J.: PAMW, 31, 965, 1961.

81. Lamprecht W.: Stoffwechsel Energetik und regulatorische Mechanismen der Herzmuskelzelle. Verhandl. d. Deutsch Gesellschaft für Kreilaufforschung. Darmstadt. 1961. — 82. La Due J. S., Wróblewski F.: Circulation 11, 871, 1955. — 83. La Due J. G., Wróblewski F., Karmen A.: Science, 120, 317, 1954. — 84. Laragh J. H., Ullick S., Januszewicz W., Deming A. B., Kelly W. G., Lieberman S.: J. Clin. Investigation 39, 1019, 1960. — 85. Lindner J.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961. — 86. Lojda Zd.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961. — 87. Losner S., Volk B. W.: Angiology 7, 454, 1956. — 88. Luthy E., Hegglin R.: Deutsch. med. Wschr. 86, 9, 1961. — 89. Mandel P.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961. — 90. Mommaerts W. F. H. M.: Metabolism of the heart. Physiology of muscular contraction in AA. Luisada Cardiology. Vol. I Mc Graw Hill Book Company 1959.

91. Moore C. B., Birchall R., Horack H. M., Batson H. M.: Am. J. Med. Sc. 234, 538, 1958. — 92. Niewiarowski S., Węgrzynowicz Z.: PTL 16, 24, 1961. — 93. Nydick I., Tang J., Stollerna G. H., Wróblewski F., La Due J. S.: Circulation 12, 795, 1955. — 94. Oka M.: Acta Med. Scand. 150, 313, 1954. — 95. Orłowski M., Kotlarek-Haus S.: PTL, 13, 1713, 1958. — 96. Orłowski M.: PTL, 13, 851, 1958. — 97. Orłowski M.: PTL, 13, 588, 1958. — 98. Ostrow B. H., Seinberg D., Zicklin A. F., Polis G. N., Evans J. N.: Circulation 14, 790, 1950. — 99. Page J. H.: Corcoran A. C. Arterial Hypertension Chicago 1946. — 100. Paterson M. J. C.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961.

101. Perlick E.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961. — 102. Pletscher A. P., Shore P., Broodie B.: Science 122, 968, 1936, Science 123, 992, 1956. — 103. Pletscher A. P., Shore P., Broodie B.: Pharmacol. J.: Exp. Therap. 116, 84, 1956. — 104. Pojer J., Ninger E.: PAMW, 28, 193, 1958. — 105. Poznańska: Przegląd epidemiologiczny 16, 83, 1960. — 106. Prinzmetal M., Ekmekei A., Toyoshina H., Kwoczyński J.: Am. J. Cardiol. 3, 216, 1959. — 107. Prinzmetal M. и соавт.: Ann. int. Med. 12, 1604, 1939. — 108. Raab W.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961. — 109. Rafalowicz A., Jabłońska M., Migdalska B., Muller J., Wołański A.: PTL, 15, 1285, 1960. — 110. Rafalowicz A., Soldaj H., Wołański A.: PTL, 13, 25, 1958.

111. Richterich R.: Enzyme in Klinik und Forschung. Springer Verlag. 1958. — 112. De Ritis F., Coltorti M., Giasti G.: Science 124, 32, 1956. — 113. Розанова Т. С.: Бюл. эксп. Биологии и Медицины 48, 31, 1959. — 114. Rutstein D., Ingenito E., Craig J., Martinelli M., Foley M., Goldberg B.: Lancet I., 545, 1958. — 115. Schettler G., Jobst H.: Dtsch. Med. Wschr. 80, 1077, 1955. — 116. Schroeder H. A.: Biochemical aspects of hypertension. in. A. A. Luisada Cardiology Vol. 1959. — 117. Siegel A., Bing R. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 91, 604, 1956. — 118. Skaggs L. T., Kahn J. R.: Renal pressor system in hypertension. Circulation 17, 658, 1958. — 119. Ster H. E., Ellenbogen R. E., Olson: Am. Physiol. Soc. Meeting 363, 1956. — 120. Stolarczyk J.: PTL, 16, 1786, 1961.
121. Szczeklik E.: Zawał serca. PZWL; Warszawa 1960. — 122. Szczeklik E.: PAMW, 29, 1083, 1959. — 123. Szczeklik E., Łukasik S., Orłowski M.: PTL, 14, 297, 1957. — 124. Szczeklik E., Janiakowa A., Orłowski M., Bogdanikowa B.: PTL, 19, 13, 1958. — 125. Szczeklik E., Janiakowa A.: PTL, 18, 12, 1957, oraz Zschr. f. ges. Innere Medizin 12, 639, 1957. — 126. Szczeklik E., Janiakowa A., Orłowski M.: Minerwa Medica 49, 2653, 1958. — 127. Szczeklik E., Janiakowa A., Orłowski M.: PTL, 14, 419, 1959. — 128. Szczeklik E., Kędra M., Wiktor Z.: Wczesne rozpoznawanie i zapobieganie miażdżycy. Miażdżycy. PAN 1956. — 129. Szczeklik E., Łukasik S., Orłowski M.: XX Zjazd T.I.P. 1959; PAMW, 30, 976, 1960. — 130. Szczeklik E., Janiakowa A., Potoczek St.: XX Zjazd TIP, 1959; PAMW, 30, 976, 1960.
131. Szczeklik E., Łukasik S., Janiakowa A.: Polish Med. Sc. and Hist. Bull. 3, 136, 1960. — 132. Szczeklik E.: Wiadomości lekarskie 11/12, 493, 1958. — 133. Szczeklik E., Hano J., Janiakowa A., Potoczek St., Orzechowska K.: Kardiologia Polska 4, 1, 1961. — 134. Szczeklik E., Bogdanikowa B.: PTL, 16, 1021, 1961. — 135. Szczeklik E., Hano J., Janiakowa A., Orzechowska K.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961. — 136. Szczeklik E., Bogdanikowa B.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague; 1961. — 137. Szczeklik E., Bross W., Hano J., Janiakowa A., Dyczkowska M., Orzechowska K.: 5. International Congress of Intern. Cardiovascular Society, Dublin; 1961. — 138. Szent-Gyorgyi A.: Muscle research Science 128, 699, 1958. — 139. Sznajd J.: PAMW, 30, 1, 1960. — 140. Taquini A. C., Blaguier P.: Circulation 17, 672, 1958.
141. Tochowicz L., Pasyk St., Demkiewicz Wł.: PTL, 15, 737, 1960. — 142. Tochowicz L., Demkiewicz Wł.: PAMW, 27, 519, 1957. — 143. Vague J., Simonin R., Coulomb J.: IV Congrès International d'Angéiologie, Prague 1961. — 144. Volk B. W., Losner S., Aronson S. N., Lew H.: Am. J. Med. Sc. 232, 38, 1956. — 145. Wieczorek J., Walendowska J.: Post. Higieny i Med. Dośw. 13, 50, 1951. — 146. Wiktor Z., Jacyszyn K.: PAMW, 30, 965, 1960. — 147. Wiktor Z., Jacyszyn K.: PTL, 13, 853, 1958. — 148. Wróblewski F., La Due J. S.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 90, 210, 1955. — 149. Wróblewski F., La Due J. S.: Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 91, 559, 1956. — 150. Wróblewski F., La Due J. S.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 90, 210, 1955.
151. Wróblewski F., Rueggesser, P., La Due J. S.: Science 123, 1122, 1956. — 152. Żera E., Hoffman M.: PAMW, 31, 217, 1961. — 153. Żmudziński J., Żmudzińska M.: PAMW, 31, 61, 1961. — 154. Staub H.: Schw. Med. Wschr. 90, 1417, 1960. — 155. Walawski J., Kaleta Zb.: Miażdżycy. PZWL, 1961. — 156. Olson R. E., Ellenbogen E., Iyengar R.: Circulation 24, 271, 1961. — 157. Furchgott R. F., Kwang Soolce: Circulation 24, 416, 1961. — 158. Dreyfus J. G., Schapira G., Resnais J., Scebat L.: Rev. franc. et. biol. 5, 386, 1960. — 159. Okinaka S. et al.: Arch. Neur. 4, 520, 1961. — 160. Colombo J. P., Richterich R., Rossi E.: Kli. Wo. 40, 37, 1962. — 161. Dyczkowska M. Diagnostyka enzymologiczna chorób tętnic wieńcowych (kandydat. dyssert.). — 162. Łukasik S.: Arch. Immunologii i Terapii Dośw. 9, 847, 1961.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

KORNEL GIBIŃSKI

ЖЕЛУДОК

Пепсин является одним из наиболее хорошо изученных ферментов. Им давно пользуются для диагностических и лечебных целей. В терапевтических целях он применяется и в настоящее время, зато обычного определения активности пепсина в желудочном соке *antiquo modo* в настоящее время пожалуй уже нигде не производят. Известны многочисленные методы, которые раньше применялись для качественного и количественного определения пепсина (а также „сычужного фермента“) в желудочном соке, полученном при зондировании. При отсутствии этих ферментов считали, что имеется атрофия

слизистой оболочки желудка. Тем не менее интерес к этому ферменту не угас, а его практическое использование приняло другие формы.

Считается, что определяемый в моче уропепсиноген является частью (около 1%) выделяемого в желудок главными клетками слизистой оболочки его прекурсора — пепсина. Этот небольшой процент попадает в кровь, откуда выделяется с мочой. Наблюдение за выделением уропепсиногена не причиняет больным никакого неудобства, чего нельзя сказать о зондировании желудка. Кроме того, этот способ позволяет довольно длительно и часто проверять изменения уровня фермента. И действительно установлено, что количество уропепсиногена в моче увеличивается после приема пищи, при состояниях, связанных с усиленной желудочной секрецией (повышенная кислотность, язвенная болезнь) и уменьшается при атрофии слизистой оболочки желудка или после резекции желудка. Однако не следует упрощать выводов о состоянии выделительной функции желудка путем определения уропепсиногена. Следует иметь в виду, что само проникновение фермента в кровь может изменяться независимо от выделения его в желудке. Окончательно не выяснено, связано ли увеличение количества уропепсиногена в моче после применения кортикостероидов с более обильным выделением пепсиногена в желудке. Установлено также, что увеличение выделения уропепсиногена имеет место при некоторых стрессовых состояниях вероятно в зависимости от эндогенных стероидов. Поэтому необходимо с осторожностью интерпретировать результаты при патологических состояниях, протекающих с шоком, таких, например, как прободная язва желудка или двенадцатиперстной кишки, массивное внутреннее кровотечение и другие. Следует также помнить, что выделение уропепсиногена с мочой зависит и от состояния почек и диуреза. Наконец, при некоторых заболеваниях может проявиться сильная протеолитическая активность мочи, специфически или неспецифически тормозящая уропепсиноген.

Все это до определенной степени объясняет разнообразие результатов, которые получили различные авторы, стараясь использовать анализ уропепсиногена в гастронологической диагностике.

Случается иногда, что выделение соляной кислоты уменьшается без атрофии слизистой оболочки желудка. В этих случаях желудочный сок может содержать пепсиноген. Зато полное отсутствие пепсиногена в желудке встречается только при очень тяжелых заболеваниях этого органа, приводящих к атрофии его слизистой оболочки. Таким образом, отсутствие пепсиногена может являться более чувствительным показателем атрофии слизистой оболочки желудка, чем ахилия. Пол века тому назад для определения активности пепсина пользовались целым рядом способов, как качественных, так и количественных, основанных на переваривании желудочным соком фибрина, куриного белка, казеина и др. белков (125). В настоящее время эти способы имеют лишь историческое значение. Интерес же к уропепсиногену в диагностических целях все еще остается живым (16, 17, 32, 38, 62, 74), хотя этот фермент известен более, чем сто лет.

В клинической практике, как известно, о функции слизистой оболочки желудка или атрофии ее обычно судят по определению кислотности полученного зондом желудочного сока. Хотя это две разные выделительные функции, не приходится удивляться, что исследователи начали сравнивать результаты титрования желудочного сока, с результатами определения уропепсиногена в моче. В то время, как одни считают, что имеется соответствие между кислотностью желудочного сока и выделением уропепсиногена (62), другие подчеркивают, что такого параллелизма не существует ни у здоровых, ни у больных (32).

Существует убеждение, что в тех случаях, в которых по разным причинам невозможно произвести зондирования желудка, исследование уропепсиногена может заменить определение кислотности желудочного сока, а отсутствие уропепсиногена может свидетельствовать об атрофии слизистой оболочки желудка и обычно сочетается с ахилией. Повышенная кислотность желудочного сока при повышенной пепсинной активности мочи встречается менее часто, хотя такой параллелизм и имеет место.

Попытки диагностического использования пробы на уропепсиноген пошли, однако, дальше, в направлении диагностики язвенной болезни и дифференциальной диагностики ее с раком желудка. Основанием для такой диагностики явилось представление о роли повышенной кислотности и усиленной пищеварительной функции желудочного сока в развитии язвы, особенно в двенадцатиперстной кишке. Некоторые авторы сообщают, что в 90% случаев язвенной болезни с локализацией в двенадцатиперстной кишке активность уропепсина была более высокой, чем в норме, в то время, как примерно у 90% больных с раком желудка отмечается снижение активности уропепсина в моче (17, 38, 62). К сожалению эти различия стираются при язве желудка, где эта проблема является особенно важной (17, 38, 122). В этой области дифференциальный диагноз до настоящего времени основывается на рентгено- и эндоскопических данных, и поэтому значение уропепсиновой пробы для повседневной клинической практики с этой точки зрения следует считать сомнительным. Она может иметь значение лишь в отдельных случаях. В качестве такого исключительного обстоятельства предложено использование этого теста в случаях кровотечений из верхнего отдела желудочно-кишечного тракта неизвестной этиологии. Каждый клиницист хорошо знаком с таким положением вещей, когда состояние больного еще не позволяет производить исследований с целью установления источника кровотечения, когда не только нет возможностей уточнения диагноза, а имеются колебания в отношении выбора способа лечения, терапевтического или хирургического. В этих условиях простая проба, которая бы указывала на значительную разницу между язвенной болезнью и раком желудка, могла бы помочь в решении вопроса (122).

Связь, которая существует между уропепсиногеном и выделением слизистой оболочки желудка, с язвенной болезнью, неожиданно выявила еще и другую проблематику. Уже ряд лет клинические наблюдения указывают на ulcerогенную опасность кортикотерапии. Это ulcerогенное действие приписывают усиленной желудочной секреции под влиянием АКТГ или самих глюкокортикоидов, и тем самым усиленной переваривающей активности желудочного сока. На собаках после гастрэктомии показано, что пепсиноген крови имеет желудочное происхождение, и что однократное введение АКТГ вызывает увеличение его в плазме на 14—49%. Такой реакции не наблюдается при хронической недостаточности надпочечников. Отсюда возникло предложение определения пепсиногена как показателя функционального состояния коры надпочечников (16, 70, 140, 141). Ясно, что ввиду доступности материала для анализа, прежде всего переключились на уропепсиноген в моче. А поскольку известно, что раздражение системы гипофиз-кора надпочечников имеет место при различных „стрессовых“ ситуациях, уропепсиногенная проба в свою очередь нашла применение при заболеваниях венечных сосудов, для дифференциальной диагностики инфаркта миокарда от стенокардии без инфаркта (67, 71). Это использование уропепсиновой пробы представлено в другой главе, здесь мы только напоминаем о ней, так как она связана с физиологией и патологией желудка.

Представленный здесь комплекс зависимости „стрессов“ (безразлично, патологических, или являющихся отображением напора ежедневной жизнен-

ной ситуации на отдельного человека), возбуждения системы гипофиз-надпочечники, желудочной секреции и переваривающей функции желудка с патологическими проявлениями включительно, является прекрасным примером богатой проблематики, которую ферментология вносит в общую патологию, диагностику, терапию и профилактику, а заодно иллюстрирует связь между гормонами и ферментами, то есть между регулирующей и продуцирующей системами. Представленный в упрощенном виде вопрос возможно не дает полного представления о богатстве проблем, которые ждут здесь решения. Так, например, простой эксперимент позволил нам взять под сомнение утверждение, что увеличение переваривающей способности желудочного сока, и следующая за этим опасность возникновения пептической язвы, а может быть и рост пепсинной активности в крови и моче, являются



Рис. 49. Исчезновение слизи из желудочного сока в присутствии преднизолонa. Первая пробирка слева перед инкубацией, вторая — через час, третья через 2 часа инкубации с преднизолоном, четвертая — через 2 часа инкубации без преднизолонa.

следствием экскреторного раздражения слизистой оболочки желудка глюкокортикоидами. Не отрицая и этой возможности, нам удалось установить, что при прибавлении глюкокортикоидов к желудочному соку *in vitro* количество остаточного азота после часовой инкубации увеличивается в сравнении с контрольной пробой, а количество белка и слизи заметно уменьшается (91).

Таким образом дело заключается не в усиленной секреции, так как материал *in vitro* не имел контакта со слизистой оболочкой желудка, а в активации его гормоном, что приводит к усилению протеолиза и уменьшению количества слизи. Общепринято считать, что муцин совершенно не поддается воздействию пепсина и защищает желудочную стенку от переваривающего действия сока. Устойчивость муцина к пепсину объясняли его кислотностью. Однако этот вопрос окончательно не разрешен. Трудно себе представить, чтобы муцин не обладал возможностью регенерации на месте. Таким образом из наших экспериментов следует сделать практический вывод, что если речь идет о желудочных осложнениях, то безопаснее проводить кортикотерапию парентерально,

для того чтобы не допустить повышения активности гормона в желудочном соке.

Приведенный выше пример служит доказательством того, что ферментная функция желудка, хотя известна давно, таит в себе еще много неясных вопросов, изучение которых может иметь практическое значение. Мы считаем, что в настоящее время использование ее в клинической практике является еще недостаточным.

Среди других ферментов, которые пытались использовать в гастроэнтерологической практике, назовем амилазу. В основном, это фермент поджелудочной железы и используется в диагностике заболеваний этого органа. Известно практическое значение исследования этого фермента, особенно при острых заболеваниях поджелудочной железы. Известно также, что поджелудочная железа легко реагирует на заболевания соседних органов, что может вызвать расстройства в ее экскреторной функции. В этих случаях источником увеличенного количества амилазы является сама поджелудочная железа. Известно, однако, что источником амилазы является не только поджелудочная железа, и что она имеется, хотя и в небольших количествах, в слюне и желудочном соке. Поэтому в некоторых случаях прободной язвы желудка, например, вытекающее в брюшную полость желудочное содержимое может являться источником повышенного уровня амилазы в крови. Данные на большом материале, а именно тысячи больных с прободной язвой желудка, указывают, что это явление имеет место в 16% случаев (120, 121). Знакомство с этим фактом очень полезно, так как в случае „острого живота“, при обоснованном подозрении прободения язвы, повышенная активность амилазы в крови не обязывает нас к изменению диагноза в пользу острого панкреатита. Решение этого вопроса имеет огромное практическое значение, так как от него зависит выбор метода лечения — консервативного или экстренного хирургического. Повышенная активность амилазы в крови, если только помнить, что источником ее может быть прободная язва желудка с всасыванием излившегося в брюшную полость содержимого, не заставит нас воздержаться от экстренной операции у больного с типичным язвенным анамнезом и острыми брюшными симптомами.

Здесь следовало бы остановиться также на пробах определения лактатдегидрогеназы в желудочном соке для диагностики рака желудка. Принцип этого способа вытекает из наблюдения, что опухолевые клетки особенно богаты этим ферментом. Это является как бы продолжением предложенного Wróblewski исследования экссудатов в отношении их опухолевого происхождения. Экссудат, оставаясь в контакте с опухолевыми клетками, отличается особенно высокой активностью лактатдегидрогеназы. У больных с раком желудка такого роста активности этого фермента в желудочном соке не отмечается. Но во всяком случае активность этого фермента в желудочном соке превышает активность его в сыворотке крови (127). Однако правы те авторы, которые считают, что результат анализа желудочного сока зависит от слишком большого количества побочных факторов, как pH, примесь крови или слюны и так далее, а результаты, полученные у раковых больных слишком мало отличаются от результатов, полученных у больных, не страдавших раком, чтобы эта проба могла иметь диагностическое значение (77).

В заключении следовало бы посвятить несколько слов также ферментативному процессу образования соляной кислоты в желудке. В общих словах принцип процесса заключается в том, что обкладочные клетки богаты ангидридом угольной кислоты, который, под влиянием карбоангидразы (большое количество которой имеется в этих клетках) превращается в угольную кислоту. Последняя сразу же диссоциирует. Ионы водорода вместе с ионами

хлора немедленно переходят в экскрет, тогда, как угольные анионы возвращаются в кровь и там занимают место хлорных. Благодаря тому, что мы имеем в руках ингибиторы карбоангидразы, мы можем препятствовать образованию соляной кислоты, что и используется в терапии (39) и о чем речь будет в соответствующей главе.

ПЕЧЕНЬ

Несмотря на то, что в гастроэнтерологии ферменты желудка и поджелудочной железы были изучены раньше всего и издавна используются как с диагностической, так и с терапевтической целью, то однако наибольший успех переживает сейчас ферментология, связанная с печенью. Чтобы полностью понять, в чем сегодня заключается значение ферментных анализов при заболеваниях печени, следует задуматься, на чем основывалась диагностика печеночной патологии вчера. Как наши сведения о печеночной паренхиме, так и диагностика этих процессов, формировались постепенно и с большим трудом.

Наши представления о наиболее частых заболеваниях печеночной паренхимы были туманными, а этиология их неизвестна. Достаточно вспомнить хотя бы названия *icterus simplex* или *icterus catarrhalis*. Также и наша диагностика не имела твердой основы. Анамнез и полное физикальное исследование могли дать только ориентировочные данные. Главный диагностический симптом „желтуха паренхиматозного типа“ по существу непосредственно не связан с основным патологическим процессом, ни с патогенетическим фактором. В настоящее время известно, что многие случаи гепатита, особенно у детей, могут протекать бессимптомно. С другой стороны, так называемые печеночные пробы являются совершенно неспецифическими, а нередко, даже в остром периоде заболевания, при тяжелом состоянии больного, бывают отрицательными. Они являются не столько признаком поражения печеночной паренхимы, сколько поражения точно определенных узких метаболических функций.

Лишь последние годы принесли в этой области определенный и большой прогресс: 1) установлено, что наиболее частой причиной гепатита являются вирусы; 2) созданы и распространены безопасные методы макроскопического и микроскопического прижизненного исследования печени (перитонеоскопия, пункция печени); 3) разработаны ферментологические методы, доказывающие поражение самих печеночных клеток.

Из экспериментальных данных следует, что поражение печени четыреххлористым углеродом, приводящее к некрозу печеночных клеток, одновременно вызывает повышение в крови активности разных ферментов, имеющихся в печеночных клетках. Такое же соотношение между некрозом печеночных клеток и увеличением в крови уровня освобождаемых из них ферментов, удалось обнаружить у мышек, которые были заражены вирусом гепатита. Таким образом, явление, описанное первоначально у больных вирусным гепатитом, оказалось связанным не с этиологическим фактором, а с последствием его воздействия, то есть с поражением печеночных клеток. Клинические наблюдения очень быстро принесли доказательства того, что действительно увеличение активности соответствующих ферментов в крови имеет место при различных заболеваниях печени, таких, как гепатит, цирроз печени; кроме того отмечено повышение активности ферментов при инфекционном мононуклеозе, после применения некоторых лекарственных веществ, как хлорпромазин, производные дикумарола, ипрониазид, морфий, салицилаты. Кроме указанного выше четыреххлористого углерода, такие яды, как свинец,

алкоголь, действуют таким же образом, также действуют злокачественные опухоли печени, механические травмы ее, и, наконец, вторичные поражения, которые могут сопутствовать механической желтухе или венозному застою в печени (3, 18, 19, 36, 58, 79, 101, 145, 152, 153).

При этом положении вещей пришлось признать, что увеличение в крови активности ферментов печеночного происхождения не является обязательно результатом некроза печеночных клеток, а отражает и повреждения их другими факторами. Некоторые авторы считают (129), что это является результатом увеличенной проницаемости клеточной оболочки. В этом аспекте ферментативные пробы являются наиболее чувствительными индикаторами повреждения структуры — а не функции — печеночных клеток (3, 79, 84).

После вышесказанного можно понять разницу между данными, которые получают при помощи ферментных анализов и так называемых „печеночных проб“. Первые говорят о нарушении целостности клетки, другие — об извращениях происходящих в них метаболических процессов. Это вещи, не связанные непосредственно друг с другом и могут проявляться вместе или отдельно. Иногда при повреждении клеточной структуры некоторые ферменты, находящиеся в жидкой фазе, могут выходить наружу, а функциональные пробы печени могут указывать при этом на сохраненную функцию. С другой стороны, когда заболевание печени находится в неактивной фазе (старые повреждения клеток зарубцевались, а новые не образуются), ферменты не будут проникать из печеночных клеток в кровь, активность их в крови будет нормальной, а в то же время отдельные метаболические процессы в результате заболевания могут все еще происходить неправильно и результаты печеночных проб еще долго, а может быть и постоянно, будут положительными. Нам кажется, что такое объяснение может служить ответом на недоразумение, которое часто слышится в вопросе: „Являются ли ферментные пробы лучшими, чем печеночные пробы?“

Возникает вопрос, какие из ферментов имеются в достаточном количестве в жидкой фазе печеночной клетки и могут быть использованы с диагностической целью в выше приведенном смысле? Так как известно, что этих ферментов много, то возникает второй вопрос, какой из них следует выбрать для стандартных диагностических анализов? Постараемся осветить эти вопросы согласно нашим представлениям.

Приводим таблицу de Ritis и сотр. (119) чаще всего исследуемых ферментов, величины их в норме и при остром вирусном гепатите. В эту таблицу мы внесли одну поправку в пункте 21, а также дополнили данные для трансаминаз, дописывая величины в единицах, так как этот способ у нас является более популярным, чем приведение данных в mEq образовавшегося метаболита.

Следует заметить, что в таблице не приведены все ферменты, которые до настоящего времени уже послужили предметом клинического изучения. Отчетливая граница между нормой и патологией и большой диапазон шкалы показателей активности фермента при патологии дает гарантию уверенности в правильности интерпретации и возможность оценки градации патологического процесса. Произведя с этой точки зрения оценку перечисленным ферментам следовало бы опустить те из них, активность которых в плазме не отличается отчетливо при патологии. Тогда на первый план выдвигаются такие ферменты, как трансаминазы (аминотрансферазы), альдолаза, фосфогексизомераза, сорбитолдегидрогеназа, глюкозо-6-фосфатаза, а также хининоксидаза. Почти все эти ферменты не являются специфическими для печени, то есть имеются и в других тканях, поэтому при повреждении соответствующих тканей активность этих ферментов в крови также увеличивается. Нельзя по-

Таблица 13

Сравнение активности некоторых ферментов при гепатитах (по De Ritis)

Пп.	Фермент	Норма	Инфекцион- ный гепатит
1.	Альдолаза (мм^3 дифосфофруктозы, расщепленной 1 мл сыворотки /60')	3—8	25—108
2.	Глюкозофосфатизомераза (мм^3 6 фосфоглюкозы, превращенной в фосфофруктозу 1 мл сыворотки/60')	74—121	624—4660
3.	GPT (μM щавелевоуксусной кислоты образованной 1 мл сыворотки /15')	0,15—0,41 8—50	1,70—18,9 100—1100
4.	GPT (μM пировиноградной кислоты, образованной 1 мл плазмы /15')	0,11—0,36 8—50	2,95—37,26 100—8000
5.	Фумаратгидратаза (единицы/мл)	1	0—100
6.	Фосфоглюкомутаза (μM 1-фосфоглюкозы, превращенной в 6 фосфоглюкозу 1 мл плазмы /60')	0,1	0,7—10
7.	Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (единицы/мл плазмы)	0,01—0,44	0,34—4,05
8.	Фосфопируват-гидратаза (единицы Bücher)	0,01—0,33	0,27—2,46
9.	Глицерофосфатдегидрогеназа (изменение оптической плотности)	0,05—0,21	0,10—2,20
10.	Малатдегидрогеназа (изменение оптической плотности)	1,05—2,63	2,82—14,5
11.	Лактатдегидрогеназа (изменение оптической плотности)	2,0 —4,93	0,81—25,9
12.	Изоцитратдегидрогеназа (изменение оптической плотности)	0,01—0,36	0,35—8,50
13.	Дегидрогеназа алкоголя (изменение оптической плотности)	0,01 0	0,01—2,17 6—50
14.	Хининоксидаза (единицы)	12—40	14—75
15.	АТФ-аза ($\mu\text{г}$ Ф, освобожденного 1 мл плазмы /2 часа)	1	14—178
16.	Сорбитолдегидрогеназа (единицы)	0,5 —2,8	10—60
17.	Фруктозомонофосфат-альдолаза (единицы)	0,98 \pm 0,04	79,5 \pm 28
18.	Лейцин-аминопептидаза	20	109—256
19.	Глюкозо-6-фосфатаза (единицы)	10—70	71—200
20.	Глутатионредуктаза (единицы)	0—3	3—12
21.	Орнитинкарбамоил-трансфераза $\mu\text{г}$ N аммиака		

тому удивляться тенденции к отысканию такого фермента, который удовлетворял бы всем выше перечисленным условиям, и в то же время являлся бы специфическим для печени. Специфическими считаются фруктозомонофосфатальдолаза, орнитинкарбамоил-трансфераза, изоцитратдегидрогеназа, сорбитолдегидрогеназа, хининоксидаза. Большинство из них, однако, отличается меньшим различием между нормой и патологией, и прежде всего значительно меньшей шкалой колебаний патологических данных, чем первая группа указанных ферментов. Больше того, например, проба на „хининоксидазу“, которая считалась очень специфической для заболеваний печени, на материале нашей клиники, а также и других авторов (89, 15, 83), вообще оказалась не ферментативной пробой, а еще одной пробой денатурации белка (табл. 14).

Имеется еще третий, очень важный критерий, помогающий решить вопрос о практической пригодности пробы, а именно, частота положительных результатов при данном заболевании. Значение ее будет очень велико, если в каждом случае данного заболевания результат будет положительным, и очень невелико, если будет, например, 20% положительных результатов. Согласно сравнительным результатам нашей клиники, глутаминовиноградная трансаминаза отвечает этому условию, и в 100% случаев в остром периоде гепатита дает положительные результаты. Почти такой же процент положительных

результатов давала нам глутаминщавелевоуксусная трансаминаза, дифосфофруктозоальдолаза, а также лактатдегидрогеназа (45).

Все эти ферменты неспецифичны для печени. Зато карбамоилорнитин-трансфераза, на которую, как специфическую, мы возлагали большие надежды, давала нам положительные результаты лишь в 1/3 случаев гепатита (90), а разница между физиологическими и патологическими величинами была очень незначительной (смотри табл. 14 и рис. 50). Кроме того эта проба, производимая микродиффузионным способом, поглощает гораздо больше времени, (табл. 15), чем определение, например, трансаминазы. Сорбитолдегидрогеназа, хотя и специфическая, очень мало чувствительна (34). Таким образом, мы снова встречаемся с противоречиями между отдельными критериями при выборе наиболее соответствующей ферментной пробы.

В результате приведенных рассуждений мы приходим к выводу, что при заболеваниях печени с диагностической целью следует производить опреде-

Табл

Больные	SO	SF	KI	MA	NK	FA	CH	SN
A	112	-8	79	47	6	-2	132	-46
B	141	6	76	64	4	7	128	-31
B		150	260	70	1000	2800		140

Таблица взята из работы S. Nowak (89). В ней приведены сравнительные данные определения SGPT (B). В ней приведены сравнительные данные определения SGPT (B).

ление GOT и GPT (46). Первая дает большой диапазон положительных результатов и безусловную положительность результатов, другая позволяет увеличить специфичность пробы в отношении печени, путем определения взаимоотношения этих двух трансаминаз (смотри страницу 321). Очень важно приобрести достаточный опыт как в постановке, так и в интерпретации пробы.

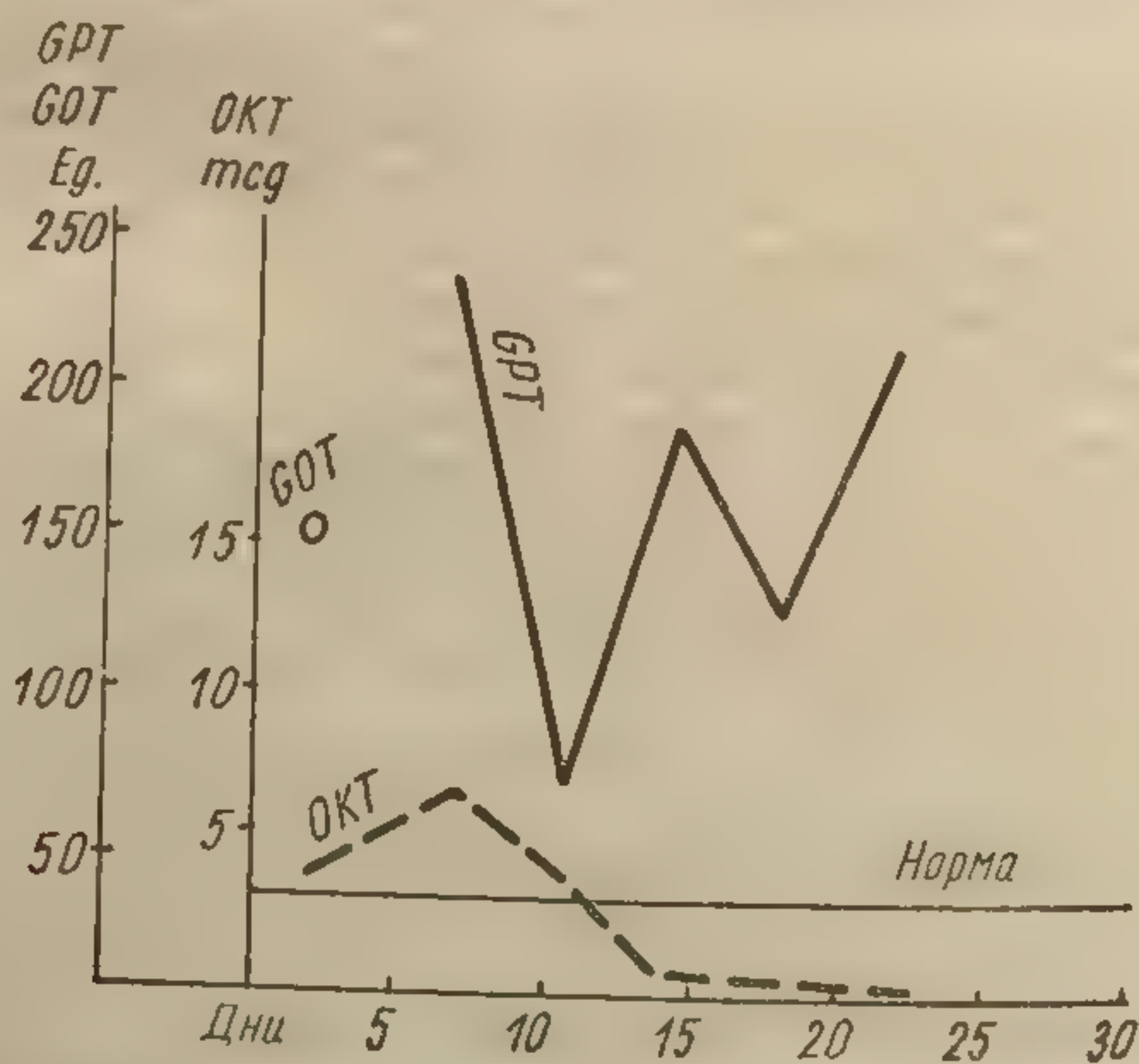


Рис. 50. Кривая активности орнитинкарбамоил-трансферазы и трансаминаз при вирусном гепатите (S. Nowak, 90).

Если по тому или другому поводу в данной лаборатории удобней ввести в качестве стандартного анализа определение другого фермента, например глюкозо-фосфат-изомеразы или одной из альдолаз, то умение правильно оценивать результаты этой пробы, особенно в сопоставлении с другими исследованиями и симптомами заболевания, может быть одинаково полезным.

De Ritis еще в 1956 г (113, 116) ввел понятие „плазмо-ферментативного комплекса тканевого некроза при гепатите“, в которое входит одновременное определение альдолаз, глюкозофосфат-изомеразы, сорбитолдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы. Этот комплекс автор считает особенно полезным ввиду его органной специфичности. Другие авторы (99) пользуются термином „ферментный спектр“.

Разные авторы предлагали разные „ферментные констеляции“ с целью увеличения точности ферментативной диагностики, и в настоящее время существует убеждение, что будущее ее лежит в разработке таких констеляций,

ца 14

CP	WB	ZL	BS	ZI	HC	PC	WG	ID	DL	AS
23	-19	60	32	61	55	3	0	128	73	36
30	-8	47	41	60	52	10	-9	133	49	40
40	680	980	1020	600	140	630	800	1360	920	200

ления активности „хининоксидазы“ в сыворотке в спектрофотометрических единицах ристоводородного хинина к сыворотке прибавлена дистиллированная вода (Б), и, для сравне-

которые, будучи характерными для каждого органа, а может быть даже и заболевания, позволили бы ставить правильно диагноз. Определенным отображением этих тенденций является введение понятия „органо-плазменной биопсии“ (33), или „биохимической биопсии“ (119), которая в биохимической форме могла бы быть эквивалентом гистопатологических диагностических критериев.

Таблица 15

	SGPT	K.O.T.
Реакция положительная	100%	33%
Результаты превышают норму	до 100×	до 4×
Длительность определения*	1,5 часа	26 часов

* Колориметрический метод для SGPT и микродиффузионный для K.O.T.

Мы относимся к этой концепции с большим сомнением. Так же относится к этому вопросу Smith (132, 133). Действительно результаты нескольких проб могут дать нам большую уверенность, чем одна проба. Но если эти результаты будут очень разноречивыми, не послужат ли они источником сомнения и блуждания в бездорожьи диагностики? Такого рода положение мы уже раз пережили в периоде разработки так называемых печеночных проб. К общепринятым вначале пробам Таката-Ара или Вельтмана присоединялись новые, которые должны были повысить точность диагностики заболеваний печени. В настоящее время все считают, что точность диагностики не зависит от большого количества произведенных проб.

Никакой комплексный ферментный тест не заменит клинического врачебного исследования больного и не освободит от других дополнительных

биохимических или биоптических анализов, которые характеризуют заболевание с другой стороны, а окончательный диагноз должен будет всегда заключаться в объединении всех данных.

Нельзя также обойти молчанием теоретическую сторону вопроса. Многие авторы находили взаимозависимость между ферментами сыворотки и печени при различных патологических состояниях этого, или других органов (57, 86, 134). По мере накопления фактов, вначале как будто бы простая концепция проникновения растворимых ферментов некротизирующейся клетки в кровь, все больше критиковалась, так как не все наблюдения можно было объяснить и понять с этой точки зрения. Многочисленность ферментов, активность которых в крови изменялась, разнообразие заболеваний и патологических состояний, при которых эти изменения происходят, привели к тому, что была оставлена концепция, что ферментативные расстройства в плазме крови могут быть отображением общих неспецифических реакций всего организма, происходящих возможно независимо от освобождения некоторого количества ферментов из поврежденных клеток (56, 57). Согласно этой концепции следовало бы взять под сомнение целесообразность поисков специфических констелляций в смысле „органно-плазменной биопсии“.

Здесь следует вспомнить также о явлении изоэнзимии, дающем возможность определить источник тканевого фермента, который мы исследуем в плазме крови. Оказывается, что один и тот же фермент, являющийся белковой молекулой, исполняющей определенную метаболическую функцию, может иметь различные разновидности. Эти различия зависят от ткани, из которой данная разновидность происходит, касается ее белковой структуры и не влияет на сущность происходящего под воздействием фермента химического процесса. Эти различия можно определить физико-химическими способами, как определение молекулярной массы, электрического заряда молекулы, и так далее. Например, обнаружено 5 разновидностей лактатдегидрогеназы, причем оказалось, что в электрическом поле медленнее всего перемещается разновидность печеночного происхождения, а быстрее всего — происходящая из сердца (142, 154). Установлено также, что дегидрогеназа молочной кислоты, обнаруживаемая в сердце и в крови больного с инфарктом миокарда, обладает свойствами альбумина, тогда, как тот же фермент из человеческой печени и сыворотки при гепатите относится к глобулинам (59). Таким образом, когда устанавливаем, что имеет место повышенная активность этого неспецифического фермента в крови, и неизвестно, является ли он печеночного или сердечного происхождения, то этот вопрос можно разрешить путем дополнительного электрофоретического исследования. Этим способом, пользуясь одним ферментом, можно добиться не меньшей, а даже возможно большей специфичности пробы, чем при определении полиферментной констелляции. Ряд авторов возлагает большие надежды на эти новые перспективы. Следует однако помнить, что эта идентификация снова значительно усложняет методику и резко удлиняет время исследования. С окончательной оценкой этих методов следует еще подождать.

Вся вышеописанная ферментологическая диагностика печени относится к исследованию плазмы. На этом, однако, не кончаются поиски исследователей. Учитывая возможность ошибок методики, незнание со всеми факторами, определяющими ферментную активность плазмы, а также, что подчеркивает ряд авторов, отсутствие параллелизма между ферментами плазмы и тканей, некоторые авторы предлагают производить ферментное исследование самой печеночной ткани, полученной путем прижизненной диагностической пункции печени (86, 134, 144).

Ясно, что пункцию печени для получения материала, нельзя сравнивать

с взятием крови для анализа. Пока еще рано высказывать свое мнение об этих предложениях. Необходимо, однако, разработать карту точной ферментной организации разных тканей (143).

К вопросу ферментных констеляций и проведения соответствующих анализов плазмы, указывающих на рост активности ферментов, освобождающихся из умирающих или поврежденных клеток, мы еще вернемся в конце изложения вопроса ферментологической диагностики заболевания печени.

Первое сообщение, обращающее внимание на аспартат-аминотрансферазу в сыворотке крови (SGOT) у больных, страдающих заболеваниями печени, привели в 1954 г. Wróblewski и La Due (146). Они пишут, что при отравлении четыреххлористым углеродом, как у животных, так и у человека, активность этого фермента в крови увеличивается в 50—100 раз в сравнении с нормой. Сходные результаты они обнаружили при гепатитах, метастазах опухолей в печень, при воспалительных процессах в желчных путях эти изменения менее выражены, а при циррозах печени активность этого фермента изменчива. Материал охватывает 100 человек. Имеются также наблюдения, что активность SGOT остается увеличенной в разное время и падает одновременно с клиническим улучшением или опережает его.

Почти одновременно и несомненно совершенно независимо, спустя лишь несколько месяцев (1955 г.), опубликовали свои наблюдения De Ritis, Coltorti и Giusti (104, 105). Эти авторы установили, что не только SGOT, но и аланин-аминотрансфераза проявляет значительный рост активности при вирусных гепатитах, в 20—40 раз. Они также отмечают, что пропорция

$\frac{SGOT}{SGPT}$, которая у здоровых равна 1,24 изменяется, доходя до 0,64 при гепатитах. Кроме того, характерные величины показателя относятся не только к вирусному гепатиту, но также и к другим заболеваниям печени, как цирроз печени, застойный отек, а также при воспалении желчных путей и застойной желтухе. Наконец, они установили, что показатель $\frac{SGOT}{SGPT}$ остается обратным

в течение периода реконвалесценции, тогда как абсолютные величины этих ферментов почти возвращаются к норме (114). Таким образом эти авторы представили не только детально разработанные клинические наблюдения, но и предложили использование их в практических целях.

С этого времени оба центра интенсивно работали над обоснованием ферментологической диагностики заболеваний печени (4, 37, 85, 110, 111, 114, 115, 147, 148, 149, 150, 151), а эти работы находили сразу отклик и подтверждение в мировой литературе, в том числе и в польской (40, 46).

Среди заболеваний печени на первое место выступает вирусный гепатит, вероятно по трем причинам: 1) это наиболее частое заболевание печени; 2) при нем невозможно непосредственно обнаружить патологический субстрат, и диагноз ставится путем дедукции, а при отсутствии желтухи диагноз очень труден; это создавало жгучую потребность для поиска новых диагностических данных; 3) именно при этом заболевании отмечается наибольший рост активности трансаминазы крови (рядом с острой желтой атрофией печени и отравлением четыреххлористым углеродом).

Теоретическое обоснование для использования предложения De Ritis и наблюдений Wróblewski дали исследования содержания трансаминазы в тканях. Оказалось, что сердечная мышца и печень имеют самое большое количество фермента. Другим моментом, подтверждающим ценность пробы, было наблюдение за изменениями трансаминаз в крови при экспериментальном вирусном гепатите у животных. Исследования, проведенные в обоих экспери-

ментальных центрах, дали сходные результаты (37, 106, 110). Вирус, введенный мышкам подкожно или в брюшную полость, появляется прежде всего и в большом количестве в печени и селезенке. Вскоре в клетках, подвергающихся цитолизу, наблюдаются глубокие ферментативные расстройства, а некоторые из этих ферментов, как фосфоглюкомутаза и обе трансаминазы появляются в увеличенном количестве в крови, достигая максимума на четвертый день. При этом отмечается интересное различие между фосфоглюкомутазой и трансаминазами, а именно, количество первой из них увеличивается в печени, а другие — исчезают. Это свидетельствует о том, что не все ферменты, активность которых увеличивается в крови при гепатитах, обязаны этим нарушению структуры печеночных клеток и расстройству проницаемости клеточной оболочки.

Эти эксперименты подтвердили также клинические наблюдения о том, что при гепатитах увеличивается активность SGOT и SGPT и одновременно изменяется их соотношение. В экспериментах De Ritis исходное отношение $\frac{SGOT}{SGPT}$ у мышек равнялось 3,57. Через 4 дня после инокуляции вируса оно падало до 0,89. У людей этот коэффициент не достигает в физиологических условиях таких высоких величин. Это значит, что активность GOT и GPT в сыворотке у людей почти одинакова, с небольшим преимуществом, однако, GOT. На материале Wróblewski этот коэффициент в среднем равнялся $1,15 \pm 0,23$ (69), а у De Ritis 1,33. При вирусном гепатите у людей этот коэффициент, согласно De Ritis, изменяется, падая в среднем до величины 0,64 (116).

Если принять, что увеличение активности трансаминаз в сыворотке зависит от проникновения этих ферментов из поврежденных тканей, причем при инфаркте миокарда их взаимоотношение не изменяется, а при гепатитах изменяется резко, следовало бы считать, что печень вероятно более богата GPT, чем GOT. В действительности дело обстоит иначе. Как из исследований Wróblewski и сотр. (151), так и De Ritis (116) следует, что в печени как и в сердце содержится больше GOT, чем GPT.

Таблица 16

Активность GOT и GPT в 1 г ткани печени и сердечной мышцы

Автор	De Ritis		Wróblewski	
	GOT μM	GPT μM	GOT единицы	GPT единицы
печень	708	531	142	44
сердце	527	146	156	7,1

Оба автора приводят результаты в разных единицах и разница в соотношении этих ферментов в их работах довольно велика. Согласно Wróblewski и La Due печень содержит в три раза больше GOT, чем GPT, а согласно De Ritis и сотрудникам лишь на 25% больше. В сердце эти различия еще больше, так как согласно De Ritis количество GPT равно примерно $\frac{1}{4}$ GOT а согласно Wróblewski меньше, чем $\frac{1}{20}$. Хотя печень отличается максимальным содержанием GPT среди всех органов, все же еще больше в ней GOT. Таким образом, если при гибели печеночных клеток наружу протекает больше GPT, чем GOT, то это вероятно является результатом какого-то физического различия между молекулами этих ферментов, а также клеточной структуры и характера повреждения клеток. Поэтому некоторые авторы предполагают

также существование дополнительных метаболических или экскреторных расстройств при гепатитах (148, 149, 150).

Это различие в изменении активности указанных двух трансаминаз при заболеваниях сердца и печени служит основанием для признания их лучшим ферментным тестом, позволяющим дифференцировать локализацию патологического процесса между печенью и сердцем. При некоторых патологических синдромах, как при синдроме Röhnheld, или в определенных клинических ситуациях это может иметь решающее значение (смотри стр. 331).

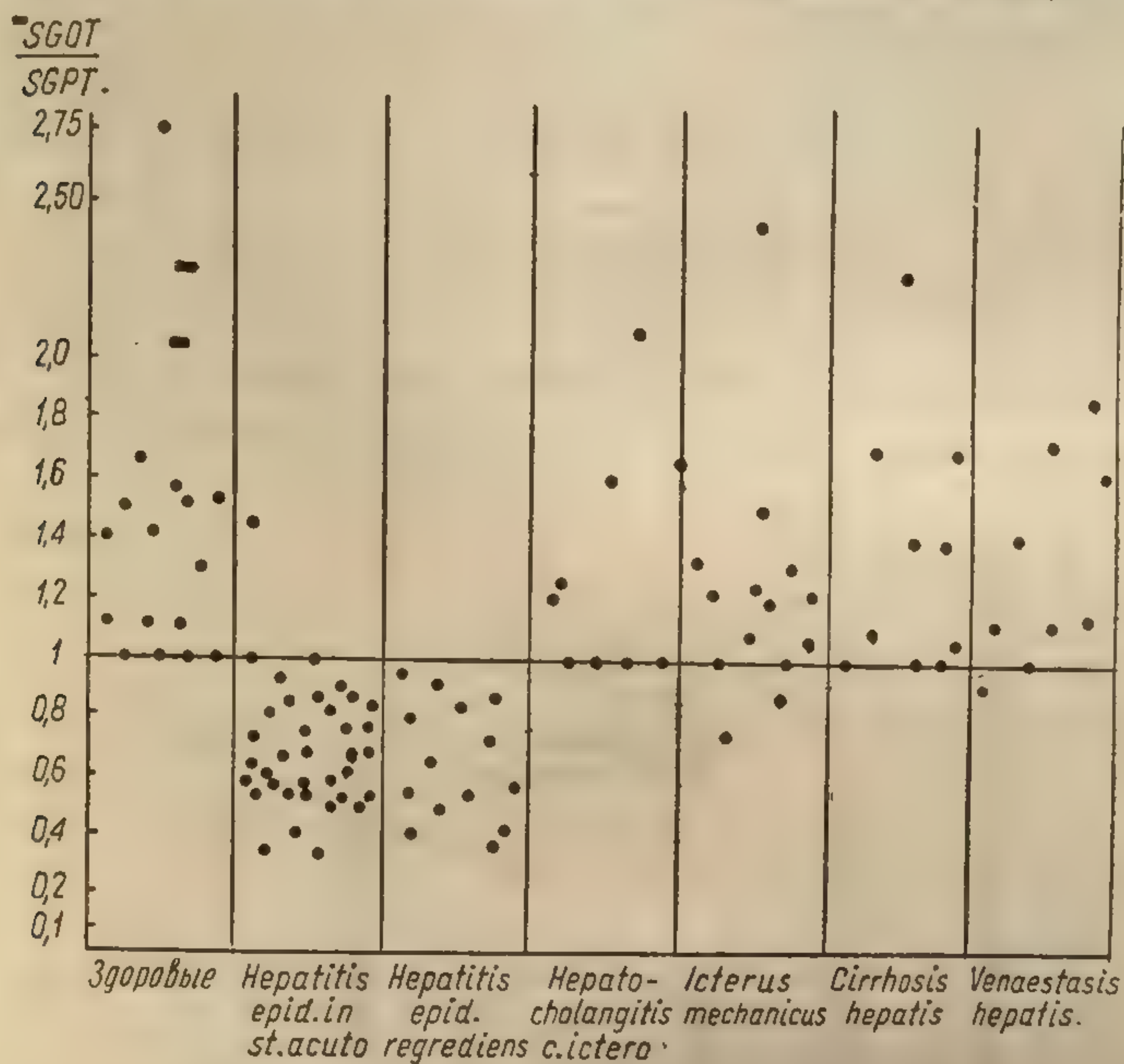


Рис. 51. Показатель $\frac{SGOT}{SGPT}$ при различных заболеваниях печени. (De Ritis и сотрудники, 116).

Также и при заболеваниях печени этот показатель может принести некоторую пользу благодаря тому, что особенно низкое падение его отмечается при вирусном гепатите, и он удерживается на низких величинах в течение всего заболевания. Это наглядно видно на рисунке 51, из работы De Ritis и сотрудников. Согласно данным Wróblewski и сотрудников, колебания коэффициента в физиологических и патологических условиях не всегда так отчетливо выражены. Другие авторы также скептически относятся к значению соотношения ферментов (9, 33). Мы на нашем материале тоже не наблюдали таких больших колебаний при различных заболеваниях печени, как это показано на рисунке 51.

Напоминаем, что коэффициент не зависит от абсолютных величин трансаминаз. Однако и абсолютные величины имеют свое диагностическое значение. Не безразлично, увеличивается ли активность трансаминазы в крови

до 100 или до 5000 единиц. Из сопоставления содержания трансаминаз в разных органах следует, что небольшое количество трансаминазы может освободиться в соответствующих условиях из различных органов, содержащих этот фермент. Однако резкое увеличение возможно только тогда, когда источником фермента являются богатые им органы, то есть печень и сердце. Но и между этими двумя источниками сама величина уровня фермента может свидетельствовать о его происхождении. Очаг инфаркта в сердечной мышце не может доставить такого большого количества фермента в кровь, как цитоллиз печени. Считается, что даже обширный инфаркт миокарда не может вызвать роста трансаминазы в крови выше, чем 500 единиц/мл. Поэтому, если при отчетливой картине инфаркта миокарда уровень фермента превышает 500 единиц, следует считать, что в этом случае кроме сердечной мышцы существует еще и другой источник притока фермента в кровь, а именно печень (36, 72, 145). Моментом, вызывающим в этих случаях повреждение печеночных клеток и увеличение проницаемости клеточных оболочек, является обычно пассивная гиперемия этого органа. Это последнее часто имеет место при больших инфарктах. Так что не только обратные величины коэффициента $\frac{SGOT}{SGPT}$ но и сама величина роста активности трансаминазы, доходящая до 1000 единиц, несомненно свидетельствует о печеночном происхождении фермента.

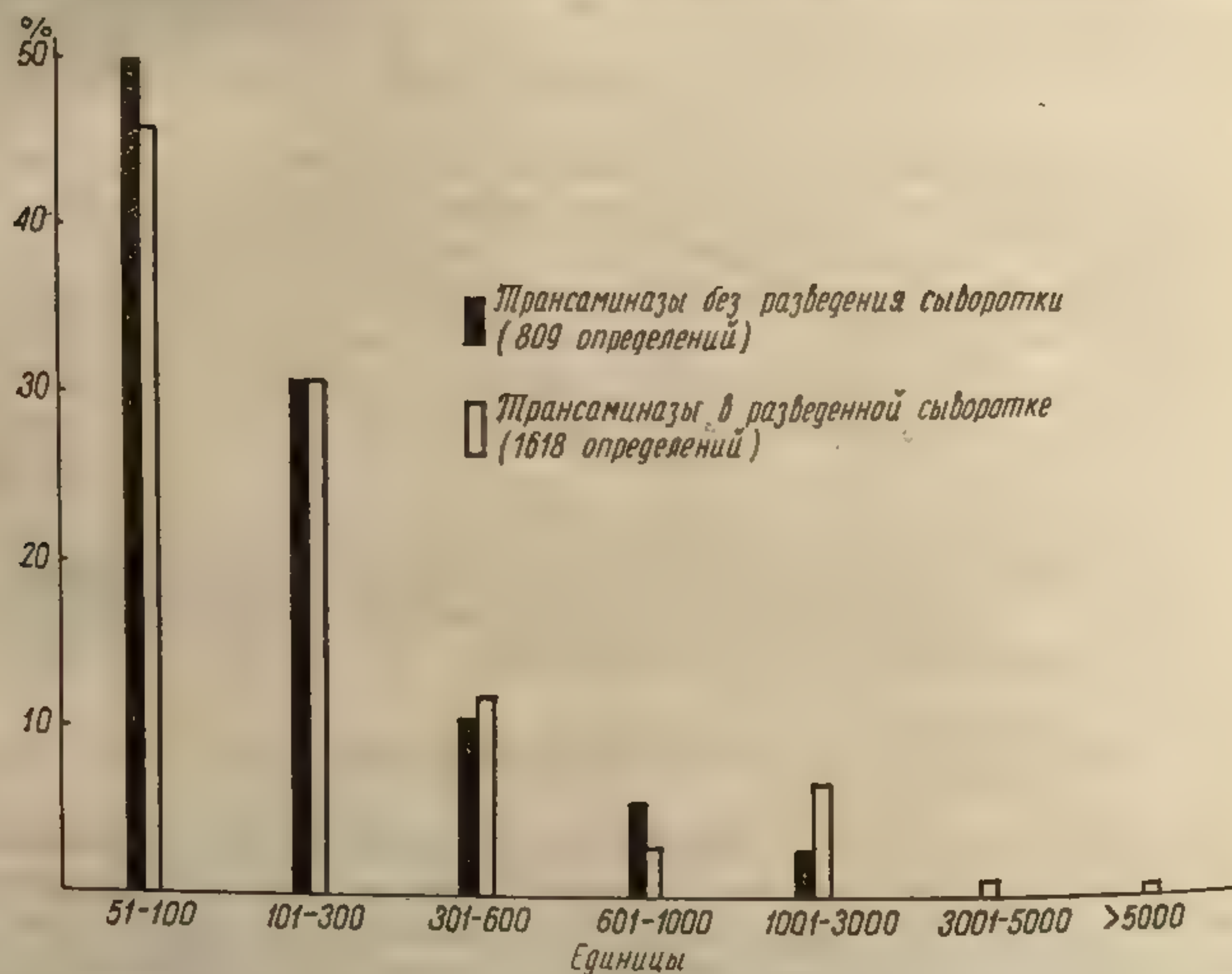


Рис. 52. Наибольшее количество — 80% патологических результатов анализов активности трансаминаз приходится на 50—300 единиц. Максимальные количества можно обнаружить лишь в разведенных сыворотках.

Однако преувеличением было бы считать, что при гепатитах постоянно получаем результаты в границах тысяч единиц. Мы неоднократно встречались с вопросом лабораторий, вводящих анализ трансаминаз, почему они не получают результатов, превосходящих 100—300 единиц. На этот вопрос можно ответить следующим образом. Такие высокие величины встречаются редко и иногда следует произвести большое количество анализов, пока попадется такое большое количество фермента. На рисунке 52 представлен наш текущий клинический материал за 2,5 года. На 5964 определений трансаминаз в 2879 случаях количество

их превышало норму. При этом количество между 3000—5000 единицами встретилось только один раз для SGOT и 18 раз для SGPT, а максимальные величины в границах 7000—8000 единиц на этом материале в несколько тысяч случаев встретились только 2 раза, исключительно для SGPT. Ясно, что в каждом случае дело касалось гепатита.

С другой стороны существуют чисто методические причины, объясняющие, почему трудно получить высокие результаты анализов. Если процесс переаминирования протекает в пробе очень быстро, и практически заканчивается раньше, чем инкубация, то не хватает субстрата для дальнейшего действия фермента и таким образом не удастся получить высоких величин. Поэтому, чтобы хватило субстрата и чтобы продолжить действие фермента до стандартного времени анализа, сыворотку с высокой активностью следует разводить. Практически, хоть это не имеет связи с билирубином, все отчетливо желтые пробы сыворотки следует для анализа разводить, что затем учитывается при окончательном расчете.

Этот вопрос связан и с другой методической проблемой, а именно, сравнимостью результатов. Оказывается, что при спектрофотометрическом и колориметрическом методе определения трансаминазной активности крови (например, Reitman и Fränkel) соответствие результатов кончается примерно при 120 единицах. Чем выше результат, тем больше расхождения (49).

И снова, как мы это уже видели, низкий коэффициент соотношения трансаминаз не только свидетельствует о печеночном происхождении гипертрансаминаземии, но указывает также на вирусную этиологию гепатита. Очень высокие абсолютные величины трансаминазной активности крови свидетельствуют не только о печеночном происхождении фермента, но и о гепатите в частности. Это видно на рисунке 53 из работы De Ritis и сотрудников.

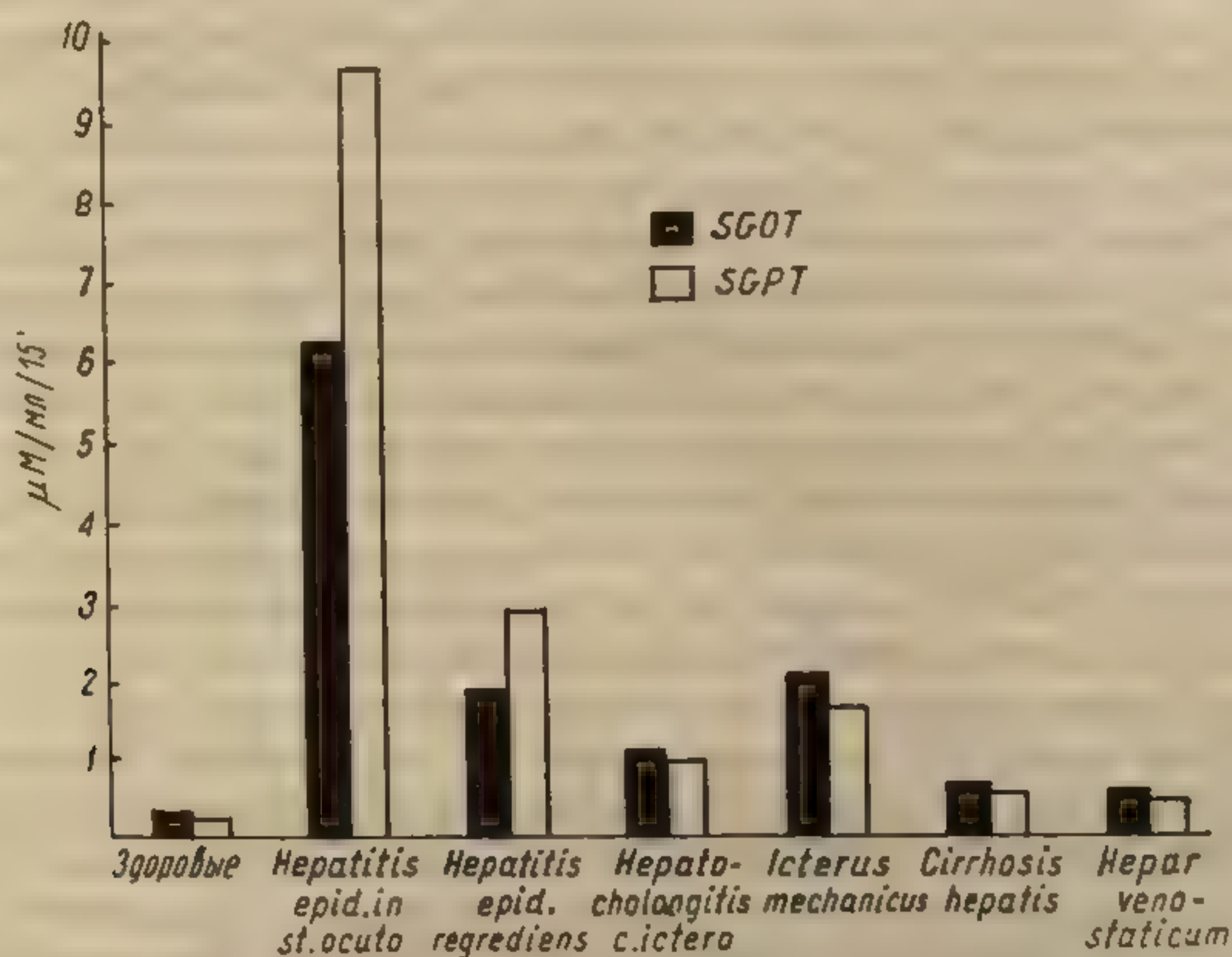


Рис. 53. Трансаминазная активность плазмы крови при различных заболеваниях печени (De Ritis и сотрудники 116).

Вообще можно сказать, что среди различных заболеваний печени увеличение активности трансаминаз является максимальным, а падение их коэффициента наиболее низким при вирусном гепатите. Максимальная величина SGOT 12300 единиц/мл встретилась нам при отравлении четыреххлористым углеродом. Однако такая этиология является исключительно редкой, что по-нашему не подрывает значения указанного выше правила. Глядя на рис. 53, калиброванный в μM полученных кетокислот, следует указать, что Wróblewski, при внепеченочной механической желтухе обнаружил активность фермента в 100—300 единиц SGOT. Такие же величины он получил при декомпенсированном или активном циррозе печени, а также при злокачествен-

ных новообразований печени (148). Существуют сообщения о более высокой трансаминаземии при застойной, чем при цирротической печени (134). В этих случаях количество трансаминаз иногда может превосходить даже 500 единиц (36).

Необыкновенно важной чертой трансаминазных проб является их безусловно положительный результат при гепатитах. Все авторы единогласно подчеркивают, что положительные результаты имеют место в 100% случаев заболевания. То же самое мы можем подтвердить на нашем клиническом материале. Это следует понимать таким образом, что хотя иногда, в отдельных случаях при этом заболевании результат может быть отрицательным, то при повторении пробы в тех же случаях результат обычно бывает положительным. То есть не 100% проб, а 100% случаев. Это объясняется определенными флюктуациями трансаминаземии в течении заболевания.

Подчеркивая таким образом диагностическое значение исследования трансаминаземии, следует обратить внимание на то, что в случаях привитого гепатита результаты анализов не отличаются от таковых при эпидемическом гепатите. Также и при гепатите в случаях мононуклеоза имеются типичные ферментативные изменения, хотя менее интенсивные. Этих изменений не бывает, если мононуклеоз протекает без симптомов поражения печени.

Насколько чувствительным показателем поражения паренхимы печени может являться определение трансаминаземии, указывает опыт с алкоголиками (3). У хронических алкоголиков введение 200 мл 45% алкоголя приводило к значительному увеличению трансаминаземии (2,18—10,85 μ M/1 мл/1 час) в течение нескольких дней, в то время, как тимоловая проба и уровень билирубина остались в норме. В группе, систематически не пьющих, и пьющих, леченых антабусом, не отмечалось увеличения трансаминаземии.

Определение трансаминаз позволило также впервые документально подтвердить преджелтушный период заболевания при вирусном гепатите. Wroblewski и сотрудники (148) произвели обследование больных без желтухи и без других симптомов заболевания в закрытом отделении для психических больных, в котором встречались спорадические случаи вирусного гепатита. Авторы обнаружили среди них отдельных больных, у которых отмечался типичный рост активности SGOT, и поставили у них диагноз безжелтушечного гепатита. В 2,17% в дальнейшем развилась желтуха.

На основании этого наблюдения авторы считают возможным диагностировать безжелтушные и субиктеривные формы заболевания, а также заболевание в продромальном периоде. К сожалению эти авторы определяли только SGOT, что давало меньше гарантии печеночного происхождения изменений. Это сразу повлекло за собой идею соответствующего направления терапии и профилактики при помощи гаммаглобулина. Известно, что это заболевание распространяется особенно часто среди детей и молодежи, в школах, казармах и так далее.

Придерживаясь этой концепции, De Ritis и сотрудники обследовали 104 детей и 11 взрослых, проживающих совместно в детском учреждении. В этом учреждении в течение последних двух лет имел место ряд случаев типичного гепатита, ввиду чего можно было считать, что там имеется эндемический очаг этого заболевания. Систематические исследования показали, что у одной трети детей имела высокая активность SGPT и низкий коэффициент $\frac{SGOT}{SGPT}$, типичные для вирусного гепатита, то есть 30% детей болело гепатитом не зная об этом. Отношение безжелтушечной формы заболевания к желтушечной равнялось 30:1. Эта неожиданность совершенно изменяет наше мнение об эпидемиологии данного заболевания (115, 119). Оказалось также, что повышенная трансаминаземия может опередить появление желтухи на 2 недели. Сотрудники вышеуказанного научного центра опубликовали сходные сообщения, касающиеся других детских учреждений и отделений новорожденных (47, 138, 139).

Та же проблема бессимптомного заражения вирусом гепатита, или же носительства вируса после перенесенного явного или бессимптомного гепатита, нашла, благодаря ферментологическому исследованию крови, еще одно чрезвычайно важное применение. Среди обследованных в Италии 247 доноров у 18 обнаружена повышенная активность трансаминазы в сыворотке крови, с обратным коэффициентом $\frac{SGOT}{SGPT}$, что указывает на заражение

вирусом гепатита (119). Можно ли удивляться так частому заболеванию привитым гепатитом после переливания крови, если 7,3% доноров являются зараженными? Соответствующие исследования, произведенные в Соединенных Штатах, показали, что когда кровь доноров исследовали на SGOT и пользовались ею для переливания только при нормальной активности GOT, привитая желтуха развивалась в 1,5% случаев, а если активность SGOT превышала 100 единиц — в 5,5% случаев. Разница между этими двумя группами была статистически значимой.

Поэтому этот способ исключения небезопасных доноров признан наилучшим среди применяемых в настоящее время профилактических мероприятий против привитой желтухи (4). После того, что уже неоднократно было сказано выше, можно ожидать, что если вместо SGOT будет производиться определение обеих трансаминаз и их соотношения, то риск переливания крови уменьшится еще больше.

Вопросами диагностики не исчерпывается та огромная польза, которую ферментологические исследования внесли в клинику заболеваний печени. Не менее важным являются изменения уровня трансаминаземии в течение заболевания. При вирусном гепатите характерные изменения трансаминаз держатся в течение ряда недель. Этим резко отличается трансаминаземия печеночного происхождения от трансаминаземии при инфаркте миокарда, при котором рост активности сыворотки имеет место лишь в самом начале заболевания, и может быть так кратковременным, что если первый анализ произвести на 3—4 день заболевания, то этого симптома может уже не быть. Это объясняется другим патологическим механизмом трансаминаземии при инфаркте миокарда. После закупорки венечной артерии некроз ткани сердечной мышцы происходит в течение нескольких часов и обычно на этом кончается приток трансаминазы в кровь. При гепатите процесс распространяется, охватывая все новые участки паренхимы печени. Измененная ткань регенерируется и может снова подвергаться некротическому процессу. Не существует лекарственных препаратов, „убивающих вирус“. Поэтому повышенная трансаминазная активность сыворотки держится все время, пока существуют клинические симптомы заболевания, постепенно уменьшаясь по мере выздоровления больного. В это время, как видно из наших наблюдений (например, смотри рисунки 55, 59, 60, 62) и что можно заметить также на рисунках, приведенных в трудах других авторов (15, 45, 115, 116), часто наблюдается периодическое увеличение и уменьшение трансаминаземии. Возможно, что это зависит от указанного выше постепенного распространения патологического процесса и поражения новых групп клеток; считается, что существует возможность расстройств метаболизма и выделения этого фермента при гепатитах. Не исключено также, что этот волнообразный характер трансаминаземии может зависеть от каких-то биологических свойств вируса. Эти колебания отмечаются у госпитализированных больных, не подвергнутым никаким ситуациям, вызывающим „стрессы“, о которых известно, что они могут ухудшать течение заболевания. От этой волнообразности вероятно зависят высокие количества трансаминаз, как в начале, так и в конце таблицы, что видно на рисунке 54, суммирующем результаты нескольких десятков случаев, находившихся под наблюдением в течение ряда недель.

Уже в начале главы мы приводили доказательства того, что не существует отчетливой связи между трансаминаземией и так называемыми „печеночными пробами“ при гепатитах, как это старались представить некоторые авторы (82). Если говорить о взаимоотношении этих двух явлений во времени,

то трансаминаземия опережает появление положительных результатов печеночных проб, а при дальнейшем течении заболевания не удастся отметить связи трансаминаземии с результатами этих проб или с билирубинемией (40).

Некоторые авторы подчеркивают параллелизм между трансаминаземией и билирубинемией, чего мы не заметили на нашем материале. Этот параллелизм

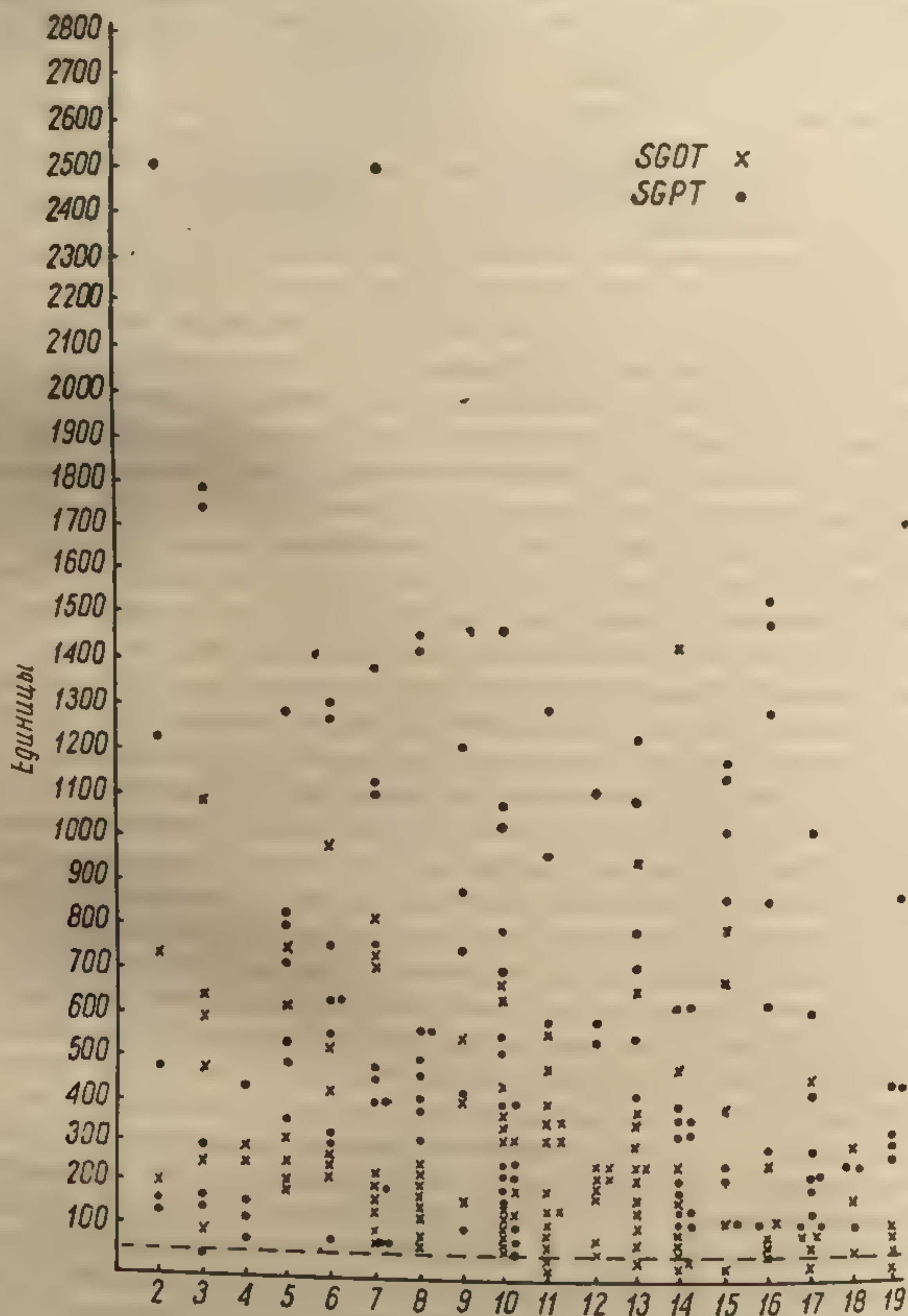


Рис. 54.

лизм является мнимым, и при фармакологическом лечении заболевания он исчезает (45).

Чрезвычайно важным является с клинической точки зрения тот факт, что изучая трансаминазему, можно следить за влиянием на течение гепатита разных дополнительных факторов, осложняющих течение заболевания, как, например, другой инфекции и так далее. Обнаружив в периоде реконвалесценции и падения трансаминаземии внезапный рост ее, мы имеем право дои-

скиваться какого-то осложнения или „стрессорного“ фактора, которые могут ничем иным не проявляться. Знакомство с этим позволило нам понять некоторые факторы из повседневной жизни клиники. Так, мы установили, что если больным после перенесенного гепатита мы позволяем рано вставать и ходить, то хотя такое раннее вставание как будто бы ничем не проявляется и больные обычно рады оставить постель, однако в этих случаях часто отмечается быстрый рост трансаминаземии.

В свете вышесказанного, мы считаем этот переход от постельного режима к хождению определенной нагрузкой, которая сейчас же отражается на течении заболевания. Это объясняет нам с давних времен эмпирически известный факт, что стационарное лечение является основным условием лечения данного заболевания, и объясняет, почему паренхиматозный гепатит не следует лечить амбулаторно, даже тогда, когда мы его считаем уже не заразным для окружающих. С этим связан вопрос преждевременной выписки из больницы. Обязательная госпитализация больных в инфекционные отделения при существующем дефиците коек приводит к тому, что при достижении клинического улучшения, по истечении 2—4 недель, больных выписывают домой, как безопасных для окружающих, чтобы освободить место для новых больных. Такое кратковременное лечение в большинстве случаев совершенно недостаточно для нормализации трансаминаземии, а контроль больных на дому нелегок. Практически этих больных дома лечат схематически, на основании субъективных симптомов, а иногда — видимых проявлений заболевания, и почти никогда не производится дальнейшего ферментологического контроля. Это создает опасность незаметного продолжения заболевания, поддержания хронического воспалительного состояния, и опасность того, что становится бедствием нашего времени — массового появления цирроза печени.

С этим связана также практикующаяся у нас посылка больных непосредственно после заболевания в санатории на период реконвалесценции. Следовало бы проанализировать при помощи исследования трансаминаз, не является ли только психогенной реакцией то, что больные обычно довольны санаторным лечением, и не является ли санаторный режим и применяемые там способы лечения слишком большой нагрузкой в раннем послежелтушечном периоде.

Из вышесказанного можно сделать вывод, что у больных, которые недавно перенесли инфекционную желтуху, следует и в дальнейшем следить за трансаминаземией (46, 87).

Если говорить о прогнозе, то трудно по единичным результатам анализов трансаминаземии, хотя бы даже очень высокой, судить о дальнейших судьбах больного. Зато определенное прогностическое значение имеет длительно удерживающийся высокий уровень трансаминаз в крови, или постоянно повторяющиеся подъемы ее, несмотря на соответствующее лечение.

Нами представлено диагностическое значение трансаминаземии главным образом при вирусном гепатите, и лишь вскользь сказано о других заболеваниях. При острых поражениях печеночной паренхимы токсического происхождения, если только процесс обратим, гипертрансаминаземия является кратковременной, и даже если была очень высокой, не является плохим прогностическим симптомом. Так, например, в упомянутом выше случае отравления четыреххлористым углеродом, описанным Wróblewski и сотрудниками (148), активность этого фермента в плазме упала через 8 дней с 12300 единиц до нормы. По существу, зная патогенез возникновения трансаминаземии, в данном случае и следовало ожидать резкого и однократного подъема уровня активности фермента.

При механической желтухе, после удаления препятствия или создания оттока желчи, активность трансаминазы сыворотки, если она была повышена, быстро падает. Это объясняется тем, что во время застоя желчи повышенное ее давление растягивает желчные протоки и механическим путем приводит к проникновению в кровь ферментов, как и желчи. Как только операционным путем будет удалено препятствие из желчных путей, исчезает повышенная трансаминаземия.

Также механическим фактором, а именно повышенным давлением в венозных синусах объясняется гипертрансаминаземия при застойной печени (26). В этом случае гипертрансаминаземию можно объяснить также увеличением проницаемости клеточной оболочки, вызванным гипоксией и даже центральным некрозом долек при снижении систолического объема крови (72). Однако тот факт, что гипертрансаминаземия встречается главным образом при острой, а не хронической сердечной недостаточности, и что она быстро исчезает после начала лечения недостаточности кровообращения, вероятно свидетельствует все же о механическом характере этого явления, как и при застойной желтухе.

Наконец, несколько слов о циррозе печени. Почти все авторы сообщают, что при циррозе печени величины трансаминазы бывают или совершенно нормальными, или же лишь слегка повышенными. Отсюда и всеобщее убеждение в сомнительном диагностическом значении исследования трансаминаз при этом заболевании. И действительно, диагноз этого заболевания мы умеем лучше ставить при помощи других данных. Однако, мы бы хотели подчеркнуть, что, согласно нашему опыту, это исследование может иметь огромное значение для наблюдения за течением заболевания, так как часто является единственным показателем его прогрессирования.

При циррозе печени дело может дойти до увеличения воспалительной реакции в печеночной паренхиме или желчных путях. При этом наступает увеличение трансаминазной активности сыворотки, причем, оба эти фактора влекут за собой опасность дальнейшего повреждения печеночной паренхимы и уменьшения более или менее компенсированной функции ее. При этом заболевании, при котором мы вообще так беспомощны, одним из немногих мероприятий, которые мы в состоянии провести, является защита печеночной паренхимы и столь возможно быстрое и правильное лечение воспалительного процесса (смотри ниже и рис. 57). За этим комбинированным процессом можно следить, анализируя трансаминаземию, и поэтому мы придаем большое значение данному исследованию при циррозе печени.

Нам кажется, что несколько примеров, взятых из повседневной клинической практики, является хорошей иллюстрацией того значения, которое имеет определение трансаминазы в крови.

1. Больная З. М. 27 лет, среди продромальных симптомов заметила у себя желтушность кожи. Печень была увеличена на 2 пальца, плотноватая. Температура нормальная. Единственной жалобой больной была общая слабость. „Печеночные пробы“, взятые сразу же, оказались отрицательными. РОЭ нормальная. Билирубинемия 3,9%. SGOT — 200 единиц. SGPT — 400 единиц. Коэффициент $\frac{SGOT}{SGPT} = 0,5$. Поставлен диагноз типичного вирусного гепатита. Лечение заключалось в соблюдении постельного режима, диеты и в витаминотерапии. Через неделю тимоловая проба оказалась положительной и равнялась 8,5 единицам, а уровень билирубина снизился. В конце второй недели тимоловая проба вернулась к норме, желтуха исчезла, уровень билирубина в крови упал до нормы. Согласно классическим критериям следовало бы считать, что наступило выздоровление. Но все еще высокий уровень трансаминаз с постоянным типичным обратным отношением их свидетельствовал о том, что заболевание еще не закончилось, ввиду чего больная оставалась в постели. Повышенный уровень трансаминаз удерживался еще в течение месяца, постепенно снижаясь (смотри рис. 55). Это и типичная волнообразность кривой (бросается в глаза соответствие между формой кривой SGOT и SGPT, что говорит против случайности этих изменений)

были единственными объективными признаками теперь уже бессимптомно протекающего заболевания, а также оправданием жалоб больной на общую слабость и отсутствие аппетита. Эти жалобы без данных уровня трансаминаз могли бы даже быть расценены как гипохондрические при очень хорошем внешнем виде больной, и именно ферментологические данные делали их полностью достоверными. После проведения в конце четвертой недели пятидневной ударной терапии тетраамицином по 2 г в сутки сразу же вернулись силы и аппетит, а активность трансаминаз в крови упала до нормы. В дальнейшем быстрая и полная реконструкция критерия патологического процесса в определенном периоде, и клинического ведения, в котором мы руководствовались почти исключительно результатами ферментных проб.

2. Больной З. Ц. 51 года в течение длительного времени жаловался на чувство сдавливания в грудной клетке, одышку и быструю утомляемость при физической нагрузке. Этим

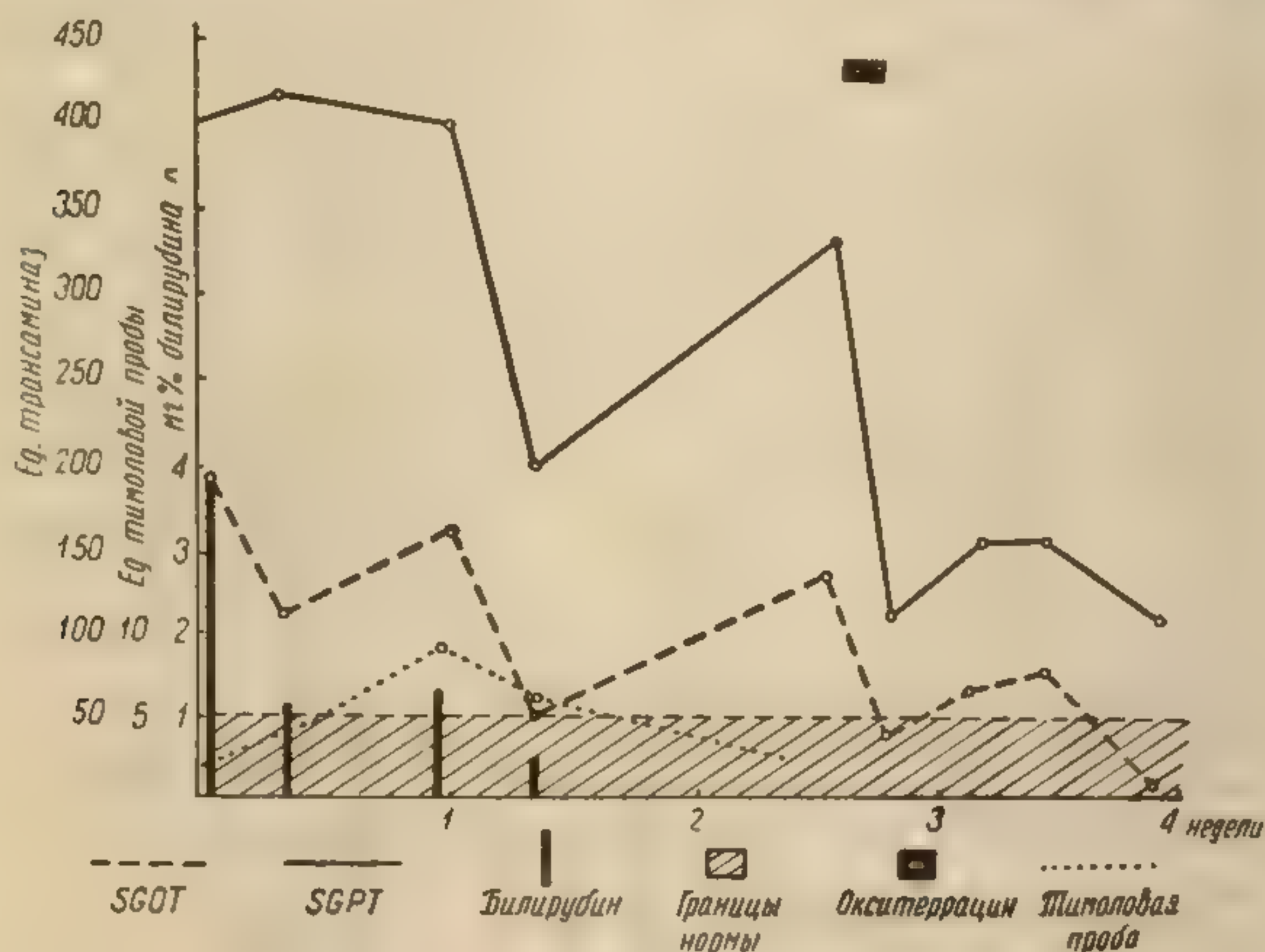


Рис. 55.

симптомам сопутствовало чувство некоторого беспокойства. Больной вел спокойный, регулярный образ жизни, придерживался диеты ввиду неопределенных желудочных симптомов. Однажды в области сердца появились несколько более сильные боли, которым сопутствовало беспокойство и общая слабость. Боли непосредственно после нитроглицерина и эуфилина не исчезли и прошли лишь со временем, но в области сердца оставалось неприятное чувство. При осмотре больного отклонений от нормы не обнаружено.

Утром следующего дня произведено ЭКГ, которая не указывала на очаговые изменения или симптомы свежего повреждения сердечной мышцы. РОЭ 1/3 мм, морфология крови без всяких изменений, кровяное давление удерживалось на прежнем уровне, то есть 120/80, моча без отклонений от нормы, SGOT = 320 единицам, SGPT = 1400 единицам. Результат анализа трансаминаз был очень неожиданным. Этот анализ был произведен для подтверждения диагноза инфаркта миокарда. В этих случаях обычно отмечается более значительное увеличение уровня SGOT, который обычно не превышает 500 единиц при массивных инфарктах. Не было никаких клинических симптомов недостаточности кровообращения. В этих условиях уровень SGPT, равный 1400 единицам, и очень низкий коэффициент $\frac{SGOT}{SGPT} = 0,23$, отчет-

ливо свидетельствовали о печеночном происхождении трансаминаземии. Больного уложили в постель, дали ему печеночную диету, витамины, эуфилин и небольшие дозы гепарина. ЭКГ повторяли пять раз (смотри рис. 56), и не обнаружили на ней никаких новых изменений. Уровень железа в крови равнялся 60 γ%. Через два дня вторично произведен анализ трансаминаз: SGOT упало до 132 единиц, зато SGPT увеличилось до 3600 единиц. Такие высокие количества встречаются редко, и то лишь при поражении печеночной паренхимы.

Показатель $\frac{SGOT}{SGPT}$ упал так низко, как мы никогда не видели в течение 5 лет постоянного

применения ферментных анализов в клинике, и равнялся 0,036. Уровень билирубина в крови 0,53 мг%, кадмиевая проба, проба Таката-Ара и йодная пробы слабо положительны, результаты остальных печеночных проб и данные о течении заболевания видны на рис. 56. Высокая гипертрансаминаземия быстро упала до нормы. Ее высота и низкий коэффициент несомненно свидетельствовали о печеночном происхождении ферментов, однако кривая трансаминаземии указывала на внезапное однократное поражение печеночной паренхимы, а не на такое, какое имеет место при вирусном гепатите. На основании этого единственного ферментологического критерия мы были вынуждены поставить диагноз токсического гепатита. Больной выздоровел. Источника интоксикации обнаружить не удалось.

В предыдущем случае анализ трансаминаземии помог в ведении больного, но он не был необходим для диагноза. В данном же случае правильный диагноз вообще был бы невозможен без ферментного анализа.

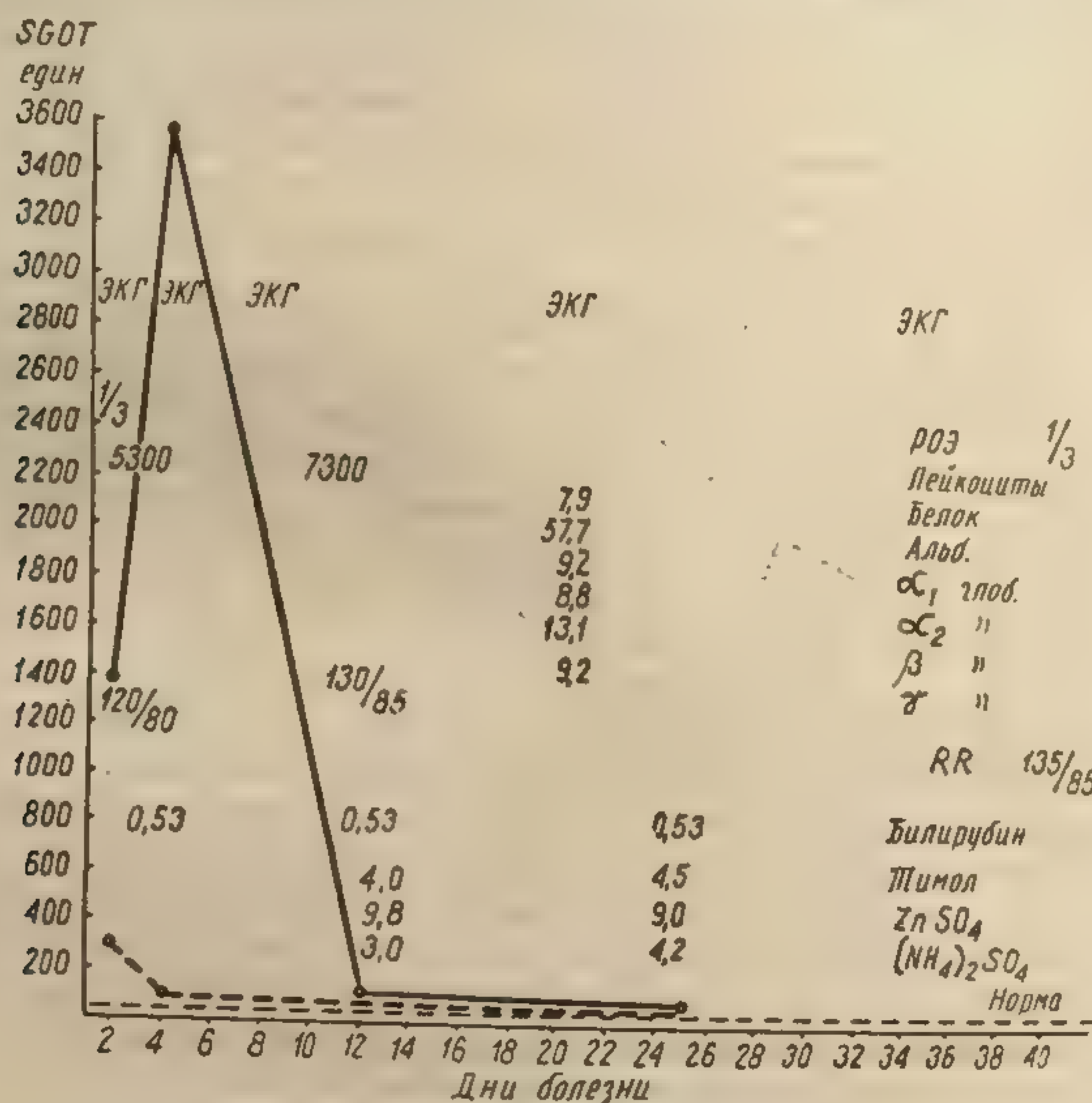


Рис. 56.

3. Больная К. К. 17 лет. 10 лет назад перенесла инфекционную желтуху. Год тому назад находилась на лечении в нашей клинике, причем, всеми доступными методами, включая лапароскопию, поставлен диагноз несомненного цирроза печени. Больная была выписана домой со значительным улучшением, ремиссия длилась довольно долго. За две недели до поступления в клинику на этот раз, повысилась температура, а неделю назад появилась желтуха, что и явилось причиной госпитализации больной. Больная инфантильного телосложения, резко пониженного питания с серо-желтым оттенком кожи, куполообразным животом. При пальпации печень твердая, с неровной поверхностью, выступает на ладонь из-под реберной дуги, болезненна. Печеночные пробы резко положительны, что на рис. 57 представляет тимоловая проба. Уровень билирубина постоянно в границах 6—7 мг%. На основании совокупности клинических данных поставлен диагноз острого холангита у больной с циррозом печени. Высокий уровень обеих трансаминаз при низком показателе $\frac{SGOT}{SGPT} = 0,7$ отчетливо указывали на поражение печеночной паренхимы. Больная в течение недели получала тетрациклин. Температура и уровень билирубина вернулись к норме, желтуха быстро исчезла, и, что нас здесь особенно удивило, очень высокая трансаминаземия, достигающая 1200 единиц SGPT, значительно уменьшилась. Однако печеночные пробы, оставшиеся положительными, указывали на то, что функция печени, как и раньше, осталась значительно пораженной, а ферментные пробы, что ликвидация инфекционно-вос-

палительного процесса в желчных путях немедленно разгрузила печеночную паренхиму.

Этот случай является примером того, как исследование трансаминаземии, подтвердило документально вредность для печеночной паренхимы воспалительных процессов, которые мы рассматриваем как внепеченочные. Этот пример показывает также, как при соответствующем лечении можно уберечь остатки печеночной паренхимы при этом тяжелом заболевании.

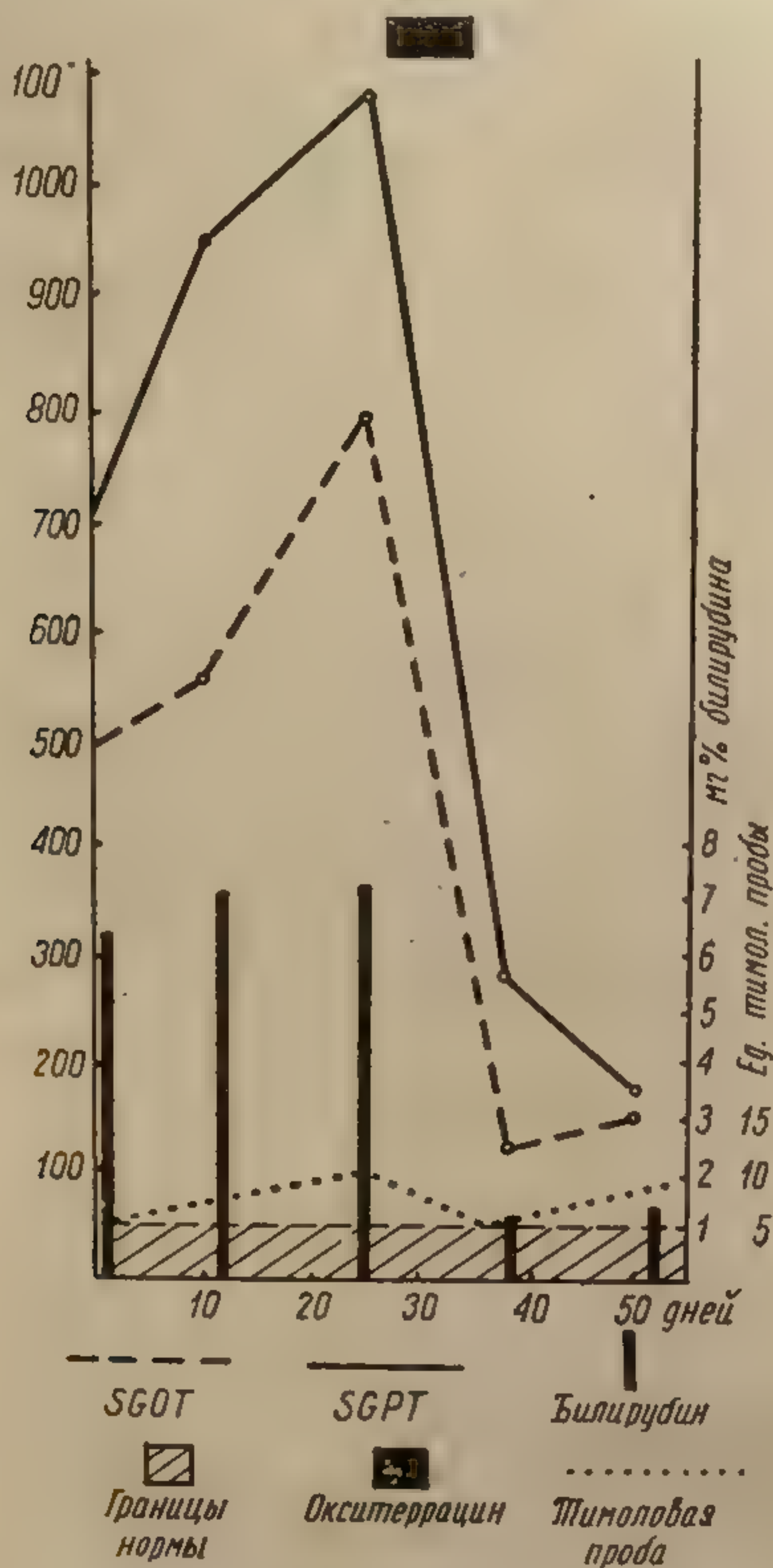


Рис. 57.

Эти три примера иллюстрируют пользу, которую нам принесло введение в повседневную клиническую практику трансаминазной пробы. Ниже мы кратко остановимся на попытках решения глубоко актуальных клинических проблем в области гепатологии при помощи той же — ферментологической — методики. А именно, в 1951 году, одновременно и независимо от других авторов (10, 24, 27, 126), мы предложили применение кортикотерапии (начиная от АКТГ) при лечении паренхиматозного гепатита, и в ряде публикаций подчеркивали эффективность этой терапии (6, 41, 42, 43). Механизм этой терапии однако оставался неясным. Было известно, что ни адренокортикотропный гормон, ни кортикостерониды, не действуют на вирус гепатита.

Возникал однако вопрос, не защищают ли они каким-то образом клетки печеночной паренхимы от токсического действия вируса. Эту проблему мы решили проследить, сравнивая изменения трансаминаземии и таких ферментов, как альдолазы, лактатдегидрогеназы, а также других факторов, в двух группах больных, одна из которых получала кортикостероиды, а другая нет. Известно, что увеличение количества перечисленных ферментов в сыворотке в определенной степени являются показателем поражения паренхимы. Наши данные (45) не свидетельствуют о том, чтобы кортикостероиды, применяемые при лечении вирусного гепатита каким бы то ни было образом защищали печеночные клетки от некроза, или ускоряли исчезновение ферментно-плазменного синдрома (смотри рисунок 58, 59, 60, 61, 62).

После разбора трансаминаз, как наиболее характерных и лучше всего разработанных в гепатологии ферментов, переходящих из поврежденных клеток в плазму, следует кратко остановиться также на особенностях других ферментов из той же группы, то есть тех, количество которых в крови увеличивается подобным же образом.

К ставшим классическими, ферментам этой группы, используемым для диагностики поражения печеночной паренхимы, относятся альдолазы (14, 28, 33, 34, 81, 75, 102, 103, 128, 137). Фруктозодифосфат-альдолаза, определение которой производилось в свое время, уступила свое место фруктозомонофосфат-альдолазе, как более специфической для печени. Первая встречается в значительном количестве также в мышцах, вторая находится только в печени и в нормальных условиях в сыворотке ее вообще не бывает. При гепатите этот фермент появляется в сыворотке, и это явление протекает также, как трансаминаземия. При заболеваниях желчных путей и застойной желтухе фруктозомонофосфат-альдолаза содержится в сыворотке в очень малых количествах, а при циррозе печени и хроническом гепатите активность ее слегка повышена. Эти различия между отдельными заболеваниями печени сти-

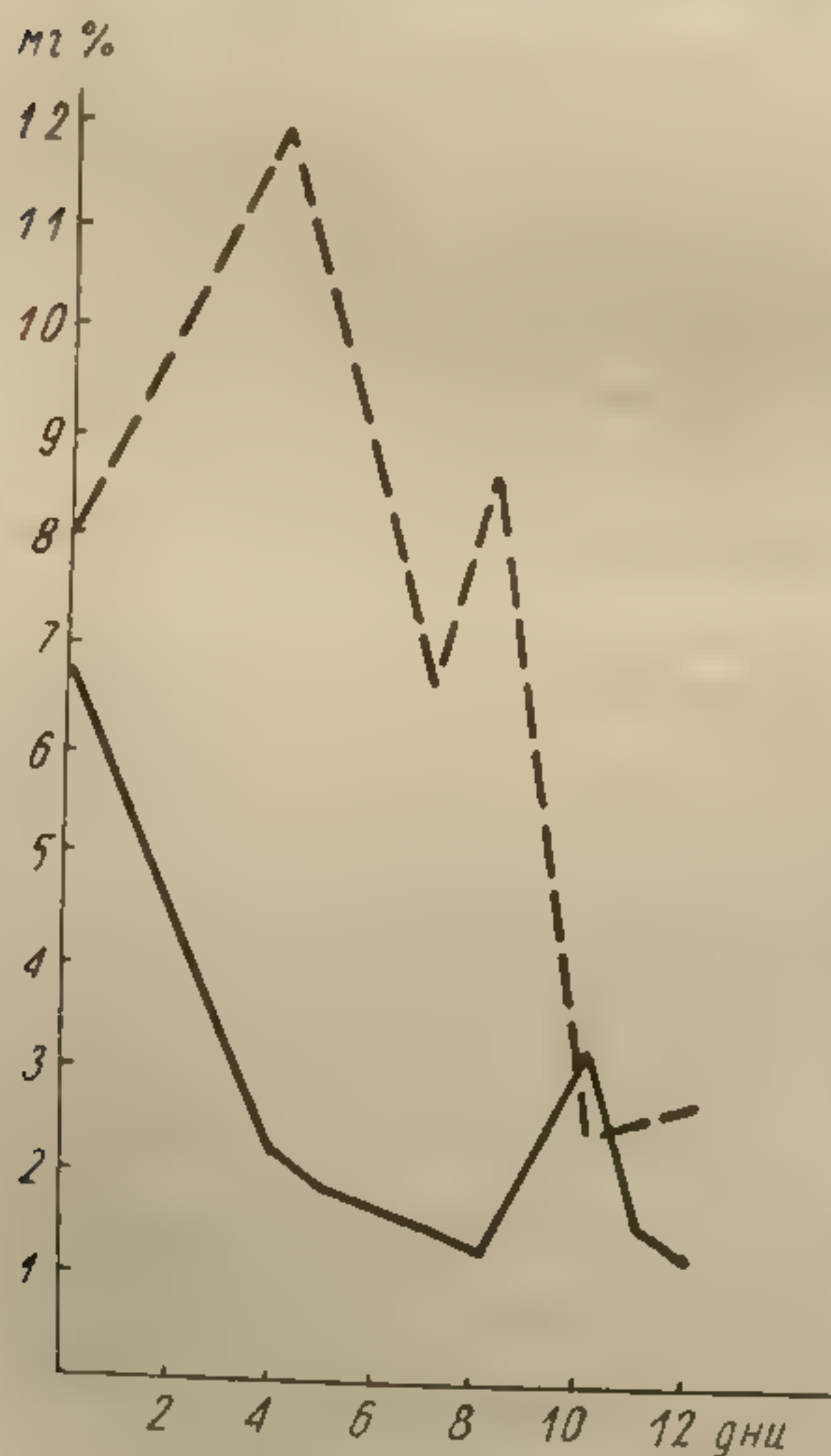


Рис. 58.

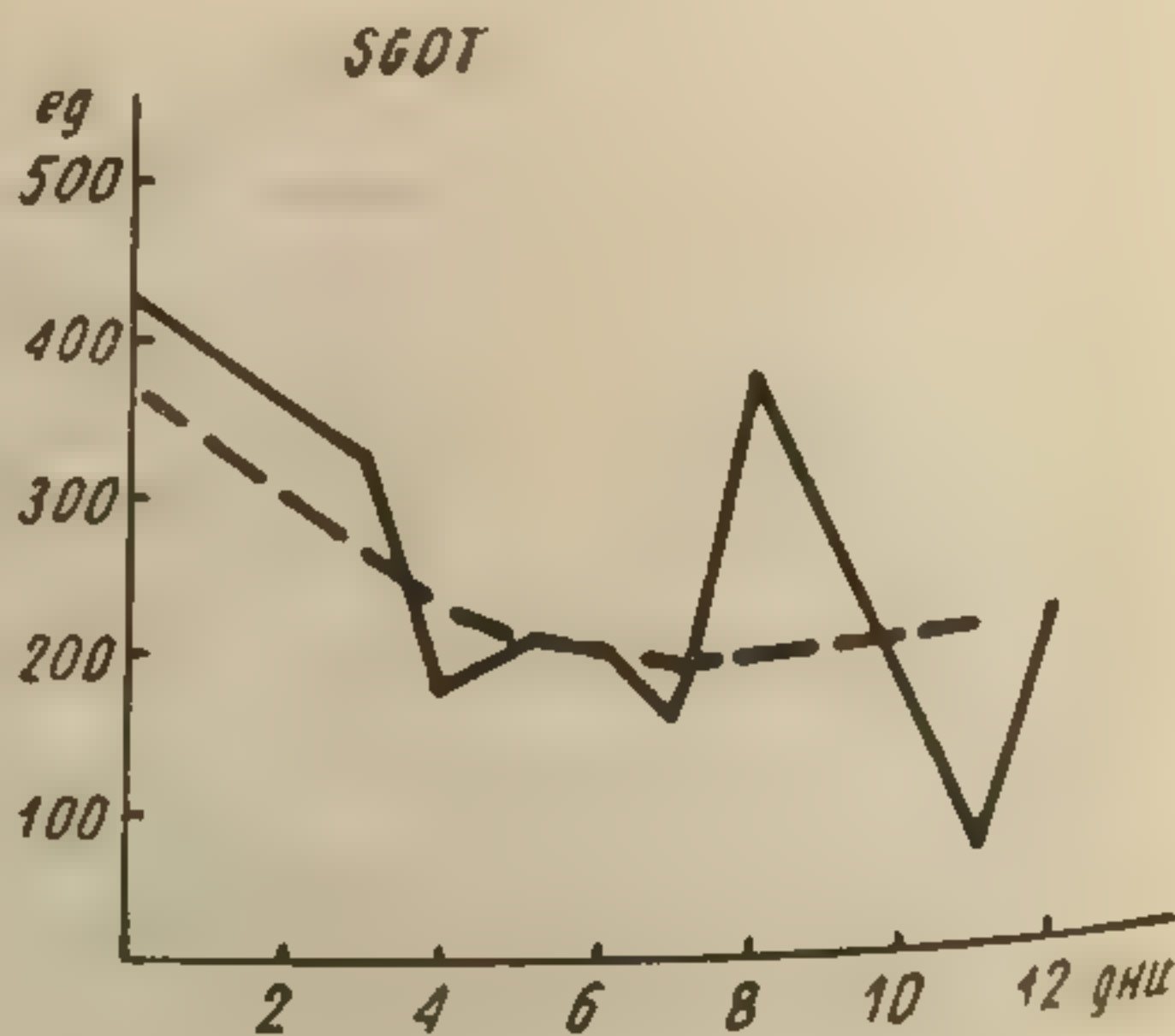


Рис. 59.

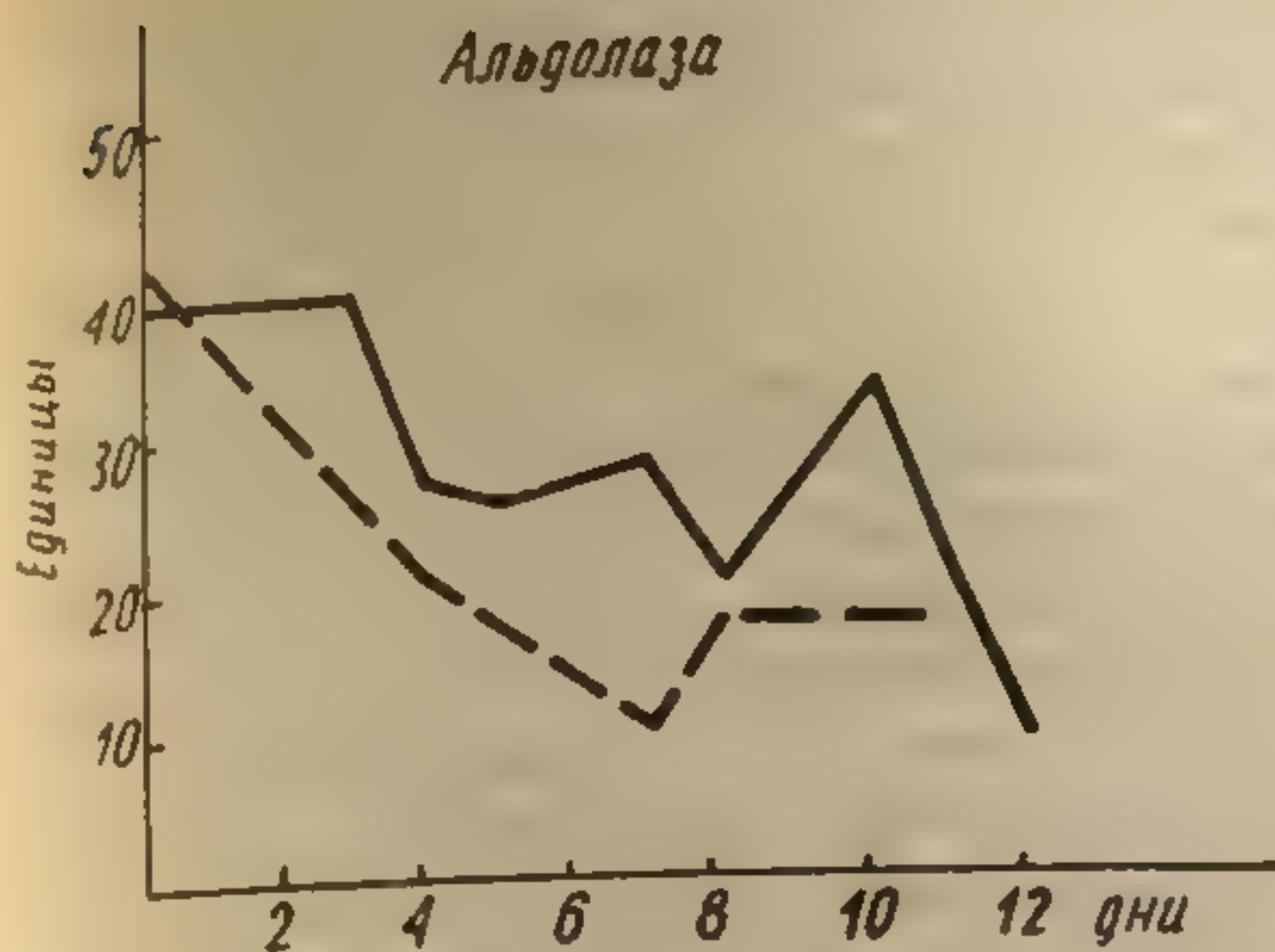


Рис. 60.

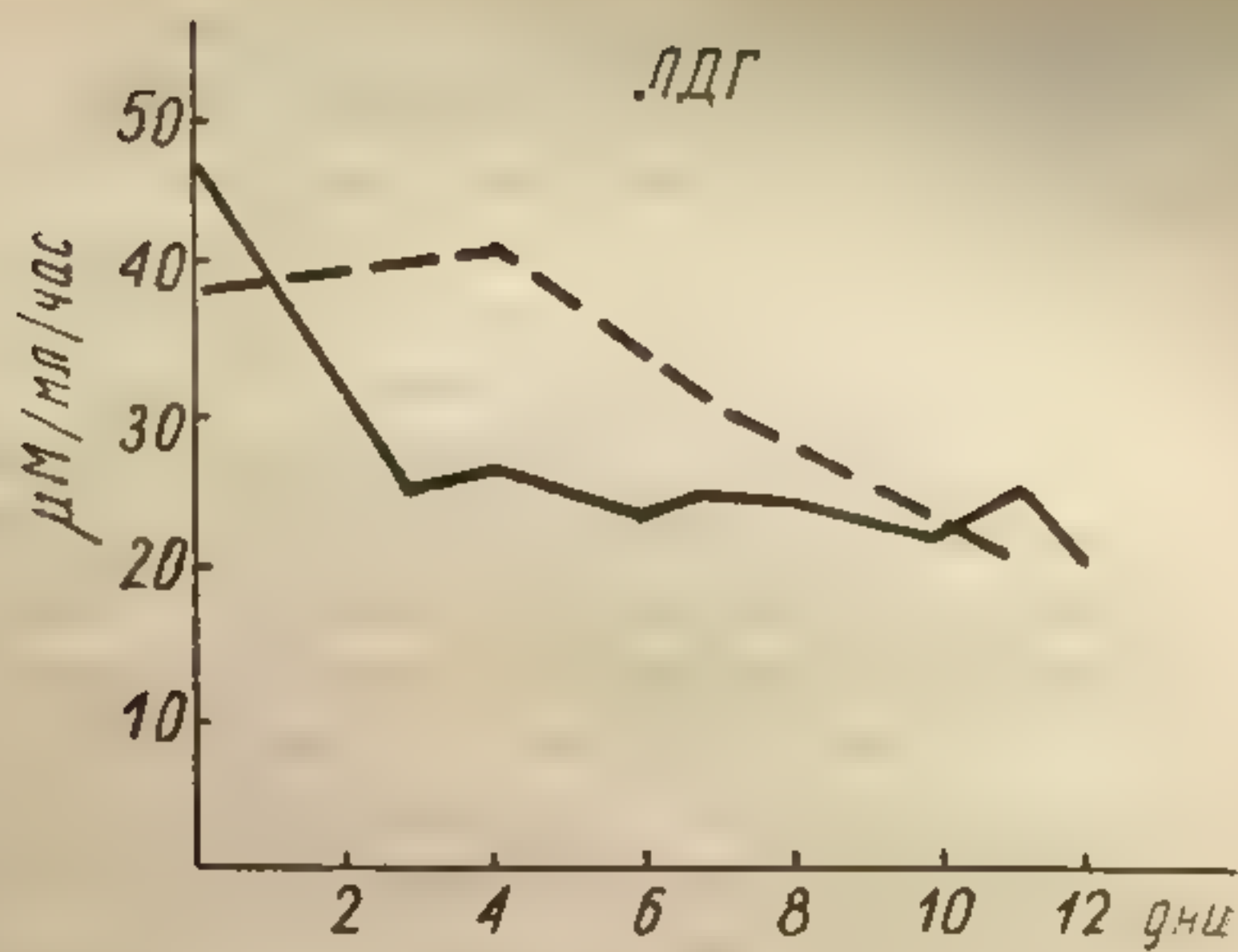


Рис. 61.

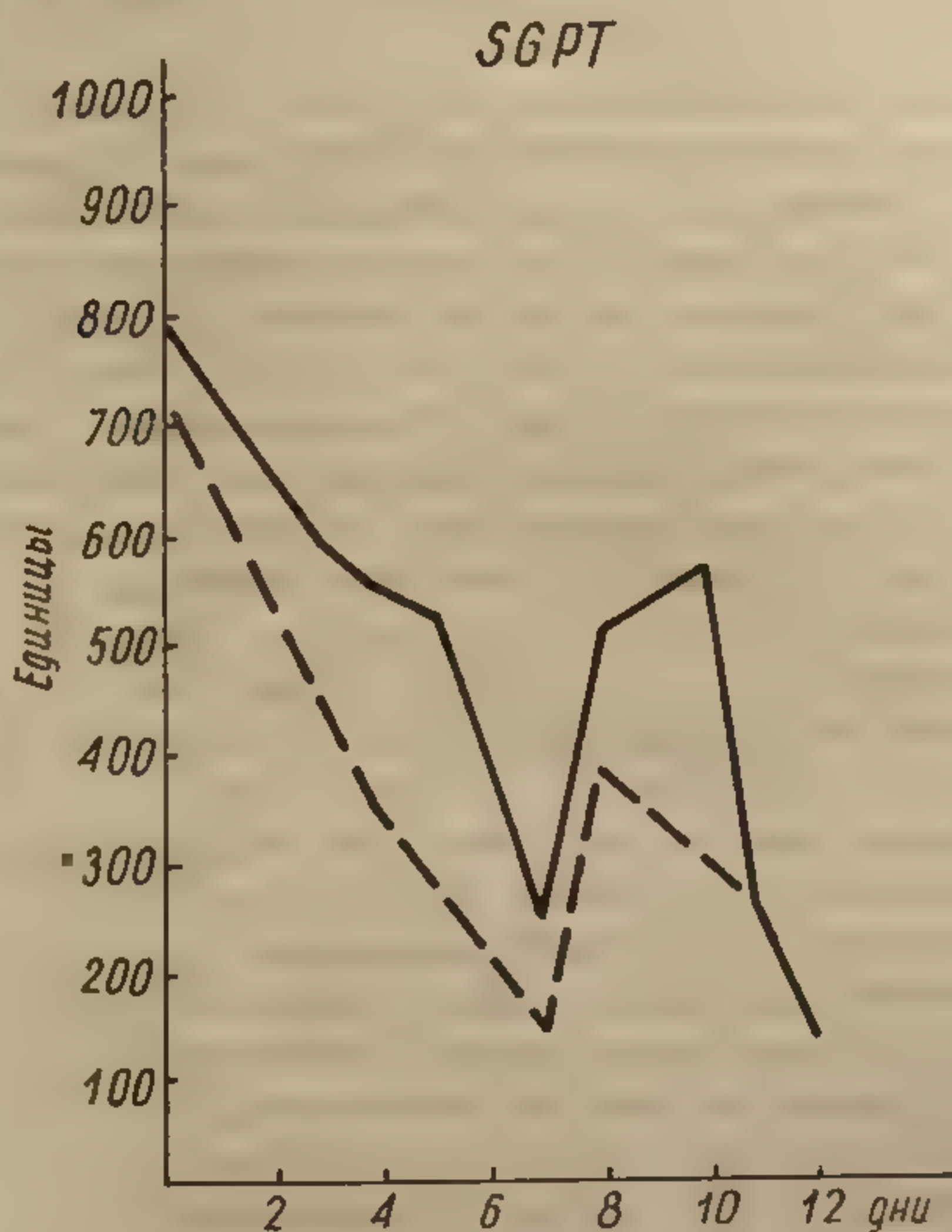


Рис. 62.

Рисунки 58—62. Средняя концентрация билирубина и активность GOT, альдолазы, лактатдегидрогеназы и GPT в двух группах больных: леченных и не леченных преднизоном. --- больные не леченные преднизоном; — больные леченные преднизоном.

раются при определении фруктозодифосфат-альдолазы. Проба очень стабильна во всех случаях, а специфичность субстрата 1-фосфофруктозы делает ее очень ценной. Однако при этой пробе шкала патологических результатов гораздо меньше, чем шкала трансаминаз. Согласно некоторым авторам (75), а также и по нашему мнению, альдолазная проба уступает трансаминазным.

Появилось довольно много сообщений об использовании различных дегидрогеназ для диагностики заболеваний печени (9, 11, 60, 61, 78, 112, 142,

154). В наших условиях их широкое распространение тормозит недостаточное количество и дороговизна необходимых реактивов ($\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$) и отсутствие спектрофотометров. Эта проба мало специфична, так как дегидрогеназы имеются в разных тканях и органах. Это особенно касается лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы. Так, например, увеличение активности лактатдегидрогеназы обнаружено, кроме инфаркта миокарда и гепатита, при гемолитической анемии и анемии Addison-Biermer, миелонидных лейкозах, тромбоцитопениях, злокачественных новообразованиях различных органов, ацидозе диабетического происхождения и других. Сорбитдегидрогеназа и изоцитратдегидрогеназа являются более специфическими для печени, но менее чувствительными. Уровень изоцитратдегидрогеназы при различных заболеваниях печени колеблется незначительно. Опыты с дегидрогеназой спиртов и особенно с глутаматдегидрогеназой показали их отчетливое проникновение в плазму крови как под влиянием отравления четыреххлористым углеродом, так и при прививке вируса гепатита, однако без какого-то заметного преобладания над другими ферментами. В сумме дегидрогеназы не завоевали себе какого-то особого места в диагностике заболеваний печени.

В последнее время большая надежда возлагается на явление изоэнзимии, о котором мы уже вспоминали выше. Возможность определить, из какого органа происходит данный фермент — в случае усиленной его активности в крови — устраняет, например, как в случае лактатдегидрогеназы, то неудобство, что фермент встречается во многих тканях. В этих случаях приходится производить дополнительное исследование, чтобы по физико-химическим свойствам фермента определить его происхождение. Это дополнительное исследование, обычно электрофорез, значительно удлиняет время исследования. Что касается лактатдегидрогеназы, то при помощи этой методики из крови выделено уже 5 фракций указанного фермента с разной скоростью перемещения в электрическом поле, которые отличаются специфическим и различным распределением в разных тканях человеческого организма. Быстрее всего перемещается фракция, происходящая из сердечной мышцы, медленнее всего — из печени (154, 142).

Экспериментальные исследования показали, что при отравлении четыреххлористым углеродом и при экспериментальном циррозе печени у крыс уменьшается активность глюкуронаттрансферазы в печени, за чем следует увеличение количества свободного билирубина в крови (23). Этот фермент не нашел применения при анализе сыворотки, однако знакомство с ним и возможность наблюдать за ним в печени также имеет большое значение так как он этерифицирует свободный билирубин, делая его растворимым в воде, и таким образом влияет на его выделение и на результат пробы Гименс ван ден Берга.

Противоположный фермент, β -глюкуронидаза, при вирусном и токсическом гепатите появляется в крови в значительно увеличенном количестве, после чего постепенно возвращается к норме. Это явление повторяется с большой регулярностью. Внезапное падение активности этого фермента в крови должно свидетельствовать о тяжелой недостаточности печени.

Особую группу ферментов, которые исследованы с точки зрения их пригодности в гепатологической диагностике, составляют пептидазы. Активность пептидаз, обозначенная на основании прироста внебелкового азота из перевариваемого пептона, претерпевает такие же изменения, как трансаминазы, примерно в 80% случаев заболеваний, протекающих с поражением печеночных клеток (64, 65). Относительно специфичности пробы более точные данные отсутствуют.

154). В наших условиях их широкое распространение тормозит недостаточное количество и дороговизна необходимых реактивов ($\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$) и отсутствие спектрофотометров. Эта проба мало специфична, так как дегидрогеназы имеются в разных тканях и органах. Это особенно касается лактатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы. Так, например, увеличение активности лактатдегидрогеназы обнаружено, кроме инфаркта миокарда и гепатита, при гемолитической анемии и анемии Addison-Biermer, миелонидных лейкозах, тромбоцитопениях, злокачественных новообразованиях различных органов, ацидозе диабетического происхождения и других. Сорбитдегидрогеназа и изоцитратдегидрогеназа являются более специфическими для печени, но менее чувствительными. Уровень изоцитратдегидрогеназы при различных заболеваниях печени колеблется незначительно. Опыты с дегидрогеназой спиртов и особенно с глутаматдегидрогеназой показали их отчетливое проникновение в плазму крови как под влиянием отравления четыреххлористым углеродом, так и при прививке вируса гепатита, однако без какого-то заметного преобладания над другими ферментами. В сумме дегидрогеназы не завоевали себе какого-то особого места в диагностике заболеваний печени.

В последнее время большая надежда возлагается на явление изоэнзимии, о котором мы уже вспоминали выше. Возможность определить, из какого органа происходит данный фермент — в случае усиленной его активности в крови — устраняет, например, как в случае лактатдегидрогеназы, то неудобство, что фермент встречается во многих тканях. В этих случаях приходится производить дополнительное исследование, чтобы по физико-химическим свойствам фермента определить его происхождение. Это дополнительное исследование, обычно электрофорез, значительно удлиняет время исследования. Что касается лактатдегидрогеназы, то при помощи этой методики из крови выделено уже 5 фракций указанного фермента с разной скоростью перемещения в электрическом поле, которые отличаются специфическим и различным распределением в разных тканях человеческого организма. Быстрее всего перемещается фракция, происходящая из сердечной мышцы, медленнее всего — из печени (154, 142).

Экспериментальные исследования показали, что при отравлении четыреххлористым углеродом и при экспериментальном циррозе печени у крыс уменьшается активность глюкуронаттрансферазы в печени, за чем следует увеличение количества свободного билирубина в крови (23). Этот фермент не нашел применения при анализе сыворотки, однако знакомство с ним и возможность наблюдать за ним в печени также имеет большое значение так как он этерифицирует свободный билирубин, делая его растворимым в воде, и таким образом влияет на его выделение и на результат пробы Гименс ван ден Берга.

Противоположный фермент, β -глюкуронидаза, при вирусном и токсическом гепатите появляется в крови в значительно увеличенном количестве, после чего постепенно возвращается к норме. Это явление повторяется с большой регулярностью. Внезапное падение активности этого фермента в крови должно свидетельствовать о тяжелой недостаточности печени.

Особую группу ферментов, которые исследованы с точки зрения их пригодности в гепатологической диагностике, составляют пептидазы. Активность пептидаз, обозначенная на основании прироста внебелкового азота из перевариваемого пептона, претерпевает такие же изменения, как трансаминазы, примерно в 80% случаев заболеваний, протекающих с поражением печеночных клеток (64, 65). Относительно специфичности пробы более точные данные отсутствуют.

Значительная часть ферментов, участвующих в обмене веществ, находится в крови. Их активность может изменяться при различных заболеваниях. Например, при поражении печени активность многих ферментов повышается. Это происходит из-за того, что печень является местом синтеза многих ферментов. При повреждении печени синтез ферментов нарушается, что приводит к изменению их концентрации в крови. Это изменение может быть использовано для диагностики заболеваний печени.

В хроническом гепатите активность ферментов повышается. Это происходит из-за того, что печень является местом синтеза многих ферментов. При повреждении печени синтез ферментов нарушается, что приводит к изменению их концентрации в крови. Это изменение может быть использовано для диагностики заболеваний печени.

22 — Клини

Производились исследования изменений определенного фермента из этой группы, а именно, лейцинаминопептидазы, при заболеваниях печени. Оказалось, что активность этого фермента в сыворотке крови повышается как при внепеченочном, так и при внутрипеченочном застое желчи. Однако для дифференциального диагноза желтух эта проба непригодна. Повышение активности этого фермента не зависит от уровня билирубина и может удерживаться гораздо дольше, чем желтуха (130). Существо реакции требует выяснения.

Следует отдельно остановиться на новом ферменте, разработанном в последнее время в Польше, γ -глутамилтранспептидазе (96, 135, 136). Этот фермент своим поведением в сыворотке крови при гепатите значительно отличается от других, описанных выше, ферментов, анализ которых стал классическим при поражении печеночных клеток. В противоположность им он отличается очень нехарактерными изменениями в остром периоде заболевания, и отчетливо растет и удерживается на высоком уровне еще долго в позднем периоде, когда активность других ферментов возвращается к норме. Таким образом мы получили новый и чувствительный способ наблюдения за периодом реконвалесценции после острого гепатита, что может иметь большое значение и в хроническом периоде заболевания, а также в установлении окончательного излечения. Тем самым эта проба может иметь большое значение для профилактики цирроза печени после перенесенного гепатита.

Значительное увеличение активности этого фермента отмечается при механических желтухах, билиарном циррозе печени и холангитах. Увеличение активности этого фермента в сыворотке при отсутствии желтухи может вызывать обоснованное подозрение на наличия опухолей печени. Хотя изменения этого фермента нуждаются в дальнейшем изучении, вышеописанные свойства прочат ему практическое применение при заболеваниях печени. Возможность замены специального субстрата, необходимого для производства анализа, более простым и доступным, несомненно будет способствовать распространению пробы.

Имеются также сообщения об увеличении уровня глутатионредуктазы в крови при инфекционном и токсическом гепатите, печеночной коме и при метастазах опухолей в печень (80).

Из других ферментов при гепатите у человека и вирусном и токсическом гепатите у животных, отмечен значительный, на 1000—3000% рост активности фумаратгидратазы в плазме крови (108), и в таком же эксперименте у животных — обеднение печени аденилпирофосфатазой, сульфидтрансферазой и сукцинатдегидрогеназой (107). Отсутствие дальнейших публикаций, хотя прошло уже 5 лет от появления первых сообщений об этих пробах, свидетельствует о их малом значении.

Описанным выше ферментам и основанным на них пробам приписывается диагностическое значение потому, что проникновение их из клеток в кровь, является доказательством повреждения клеток. В клинической практике используются еще и другие ферментативные пробы, значение которых основано на других механизмах.

В этой группе на первое место выдвигается холинэстераза. Снижение активности ее в сыворотке крови — речь идет о неспецифической холинэстеразе — встречается при заболеваниях печени, что известно давно (30, 31). Установлено, что холинэстераза синтезируется в печеночных клетках, откуда попадает в кровяное русло. Поэтому дефицит этого фермента в крови является отражением нарушения функции печеночных клеток, а не нарушения их структуры, что лежит в основе трансаминазной, альдолазной и других проб. Этим объясняется тот факт, что при острых гепатитах активность холинэстеразы в крови падает лишь незначительно, может оставаться нормальной,

а иногда даже несколько повышенной. При хронических гепатитах, когда длительный патологический процесс нарушает функцию печеночной паренхимы и особенно при развитии цирроза, активность холинэстеразы в сыворотке резко падает. Эти изменения активности холинэстеразы не зависят от этиологии гепатита, так как наряду с изменениями при вирусном гепатите, они имеют также место при токсических гепатитах. Эта проба пригодна для наблюдения за исходом гепатита в периоде реконвалесценции. Минимальные количества холинэстеразы встречаются именно при циррозе печени. Очень низкие количества имеют место также при злокачественных опухолях печени, и наоборот, слегка повышено содержание фермента при механической желтухе, вызванной камнями желчных путей, что имеет дифференциально-диагностическое значение. Венозный застой в печени при недостаточности кровообращения может также являться причиной снижения активности холинэстеразы в крови и может также до некоторой степени отражать состояние изменяющейся недостаточности кровообращения. Эти свойства делают определение активности холинэстеразы в крови ценной ферментативной пробой (25, 68, 94, 95, 123), дополняющей другие функциональные пробы печени и с другой стороны, дополняющей ферментологические пробы предыдущей группы. Это значение несколько ослабляет тот факт, что такое же снижение уровня холинэстеразы в сыворотке встречается при кахексии, пониженном питании, хронических инфекционных заболеваниях, как, например, туберкулез и так далее.

Падением активности в остром периоде инфекционного гепатита отличается также каталаза (66). В периоде реконвалесценции наблюдается возвращение ее активности к норме, а при длительном течении заболевания отмечается дальнейшее падение уровня фермента. Фермент находится в эритроцитах, и потому в них, а не в сыворотке определяют колебания уровня этого фермента.

Совершенно иначе обстоит дело с глюкозофосфомутазой. Продукция холинэстеразы в печени падает и параллельно этому уменьшается ее активность в сыворотке крови. Трансаминазы и другие ферменты „плазменного комплекса тканевого некроза“ исчезают из печени и количество их увеличивается в плазме. Активность же глюкозофосфомутазы при гепатитах увеличивается одновременно и в печени и в плазме. В плазме здоровых людей этот фермент практически не обнаруживается. Активность его в плазме появляется и иногда резко увеличивается в остром периоде гепатита, менее отчетливо в периоде обратного развития заболевания. Содержание фермента довольно часто повышается при застойной желтухе. Зато это явление не имеет места при циррозе и застойной печени (107, 113). Однако изменения ферментативной активности во многих случаях бывают нетипичными. Поэтому нам кажется, что этот фермент не станет „ферментом будущего“ в диагностике заболеваний печени. Тем не менее мы останавливаемся на нем несколько подробнее, чтобы подчеркнуть, каким сложным и разнообразным комплексом является совокупность ферментативных изменений, имеющих место при заболеваниях печени. Необходимо будет изучить происхождение и условия изменения каждого фермента в плазме (колебания глюкозофосфомутазы нам неясны), прежде, чем окончательно определить роль и место ферментологии в диагностике заболеваний печени.

В этом длинном ряду ферментов, связанных с возможностью диагностики заболеваний печени, не может наконец, не оказаться щелочной фосфатазы (фосфомоноэстеразы). Хотя этому ферменту уже довольно давно придается большое значение в диагностике, мы поместили его в конце данной главы для того, чтобы подчеркнуть еще и другой механизм появления этого фермента в крови.

Как в
таль, ак
из кост
процесс
лние п
печени
частно
гечевы
зом усн
вызван
и так
путях,
проба
Если
паренхи
ческих
имеет м
Если за
это та
тозного
свидете
острой
фермен
След
то эта
желчн
обтура
кулезе
при х
может
Отсюда
дазой)
желчн
вызван
смотря
вне- и
ным и
стичес
прстир
В к
мы хо
Нам к
лучше
того
сомне
менно
ферме
далее)
больш
други
шает
заболе
Она д

Как выявлено иммунохимическими методами, 75—93% щелочной фосфатазы, активность которой повышается выше нормального уровня, происходит из костной ткани. Этот фермент выделяется в желчь печенью, которая в этом процессе играет роль очищающего органа (53). Невозможно исключить наличие в организме других источников этого фермента и прежде всего самой печени. Однако на их долю приходится лишь небольшая часть общего количества фермента. При затруднении оттока желчи в кишечник выделение печенью фосфатазы замедляется и она накапливается в крови. Таким образом усиление активности щелочной фосфатазы в крови, если избыток ее не вызван усиленным поступлением из скелета (рахит, болезнь Page, саркома и так далее), является доказательством наличия препятствия в желчных путях, а это можно легко отдифференцировать. Как и все остальные, эта проба не является идеальной в диагностике застойной желтухи.

Если уровень трансаминазы постоянно и значительно увеличивается при паренхиматозных желтухах и непостоянно и в меньшей степени, при механических желтухах, то так здесь наоборот, значительный и постоянный рост имеет место при механических желтухах и умеренный рост при гепатитах. Если за границу нормы принять 10 единиц King-Armstrong, то 10—30 единиц это та зона, где заходят друг за друга патологические величины паренхиматозного и застойного происхождения. Количества, превышающие 30 единиц, свидетельствуют о препятствии в желчных путях, за одним исключением — острой желтой атрофии печени, где также имеет место высокий уровень фермента.

Следует подчеркнуть, что если речь идет о препятствии в желчных путях, то эта проба бывает положительной не только при полной закупорке общего желчного протока и типичной механической желтухе, но и при частичной обтурации мелких желчных ходов, например, при опухолях печени, туберкулезе, лимфогрануломатозе, при суживающем протоки циррозе, и даже при холестатическом гепатите (например, после хлорпромазина). Потому может иметь место диссоциация между фосфатаземией и билирубинемией. Отсюда, эта проба является наиболее чувствительной (наряду с 5-нуклеотидазой) не только на механическую желтуху, но и на проходимость системы желчных путей. Несмотря на то, что в определенных границах ее показатели, вызванные застоем желчи и повреждением паренхимы перекрываются, и несмотря на то, что эта проба не дает возможности дифференцировать между вне- и внутрипеченочной причиной обтурации и также между ее злокачественным или доброкачественным характером, она является очень ценной диагностической пробой (7, 53, 76, 99, 100), если только правильно понимать и интерпретировать ее.

В конце главы о ферментологической диагностике заболеваний печени мы хотели бы посвятить несколько слов оценке ферментологических тестов. Нам кажется, что в настоящее время никто уже не надеется найти один „наилучший“ фермент, который одной пробой решит дифференциальный диагноз того или другого заболевания. Мы уже вначале пытались выразить свои сомнения, исполнит ли эту роль какая-нибудь констелляция ферментов „плазменного комплекса тканевого некроза“ (или другие родственные констелляции ферментного спектра, ферментной биопсии, органо-плазменной биопсии и так далее). Ферментологической диагностике несомненно принадлежит довольно большая роль, так как она приносит важную информацию, недоступную для других методов исследования. Однако значение этих исследований не превышает значения остальных данных, а стоит в одном с ними ряду. Диагностика заболеваний печени должна остаться в руках лечащего врача, а не лаборанта. Она должна включать, кроме основного врачебного исследования, рентгено-

логические, эндоскопические и лабораторные данные. Даже в этой последней области ферментология не вытеснит всех других лабораторных анализов, а должна войти в их состав. Речь идет о том, в каком объеме. Многочисленность описанных здесь ферментов, а ведь это не все, делает трудным принятие решения. Мы бы не хотели никому навязывать своего выбора. Мы считаем, что как до сих пор разные лаборатории, со сходными результатами и равной пользой для больного, пользовались разными наборами „печеночных проб“, так и теперь они могут включить в свой обиход разные ферментные пробы. В качестве примера мы приводим комплекс лабораторных анализов, которые мы обычно производим в нашей клинике с целью дифференциальной диагностики заболеваний печени и желчных путей, вместе с обоснованием.

Таблица 17

Сопоставление лабораторных проб, применяемых в настоящее время в III Клинике Внутренних Болезней Силезского Медицинского Института в Бытоме (в настоящее время в Катовицах) для дифференциальной диагностики заболеваний печени

Проба	Обоснование
Билирубин	Исследование функции печени
Электрофорез белков плазмы	Исследование функции печени
Тимоловая проба	Исследование функции печени
Проба с сернистым цинком	Исследование функции печени
Активность холинэстеразы	Исследование функции печени
Бромсульфоталеиновая проба	Исследование функции печени
Активность щелочной фосфатазы	Исследование печеночного <i>clearance</i>
Активность SGPT	Исследование проходимости желчных путей
Активность SGOT	Ферменты плазменного комплекса
	Повреждение тканей

ПОДЖЕЛУДОЧНАЯ ЖЕЛЕЗА

Поджелудочная железа, орган, продуцирующий и выделяющий большое количество таких ферментов, как трипсиноген, химотрипсиноген, амилаза, липаза, карбоксипептидаза и другие, должна открывать широкие горизонты для ферментологической диагностики. И действительно, поджелудочная железа пожалуй была первым органом, заболевания которого распознаны при помощи ферментативных анализов. С введением зондирования двенадцатиперстной кишки появилась возможность исследования ферментов непосредственно в панкреатическом соке. Благодаря тому, что эти ферменты переходят в кровь и выделяются с мочой, их можно исследовать в этих легко доступных материалах. Однако, несмотря на это, диагностика заболеваний поджелудочной железы остается очень трудной и сомнительной. Выводы, которые можно сделать на основании результатов анализов перечисленных выше ферментов, относятся к функции поджелудочной железы, так как их продукция и выделение являются функцией этой железы. Для функциональной диагностики этого органа необходимо хорошо знать его физиологию. Хотя мы производим исследования активности панкреатических ферментов в крови, мы, однако, до настоящего времени не знаем, каким образом и где они проникают в кровь. Другим препятствием является огромная физиологическая изменчивость выделений поджелудочной железы, очень большая реактивность ее на органические и функциональные расстройства окружающих ее органов, и даже на психические раздражители. Эти раздражители действуют

как гуморальным, так и нейрогенным путем. Благодаря этому функция поджелудочной железы изменяется в значительной степени не только при заболеваниях этого органа, но и при заболеваниях соседних органов, от которых этим путем мы бы хотели их отдифференцировать. Язвенная болезнь, например, у 24% больных вызывает повышение активности амилазы в крови, а у 16% — повышение активности липазы. В дуоденальном содержимом обыкновенно отмечается высокая концентрация ферментов и тенденция к резким изменениям. При ахиллическом гастрите в дуоденальном содержимом отмечается падение ферментной активности и пониженная реактивность на раздражители. При остром гепатите примерно у 60% больных отмечается увеличение активности липазы и умеренное падение активности амилазы. При хронических гепатитах активность этих двух ферментов в крови очень часто снижается. Чаще всего эти расстройства сопутствуют заболеваниям желчных путей и особенно желчнокаменной болезни, при которой — в 60% случаев отмечаются колебания активности липазы и в 30% — амилазы (20, 21, 22). Наконец, изменилось наше представление о специфичности этих ферментов в крови. Оказалось также, что результаты анализов этих ферментов могут изменяться в зависимости от лечения (применение таких лекарственных препаратов, как опиаты и другие).

Ввиду вышесказанного, одно лишь исследование панкреатического сока, полученного путем дуоденального зондирования, оказалось недостаточным, и поэтому большие надежды возлагались на пробу с секретинном. Но и эта проба имеет ограниченное значение, ее нельзя производить при остром панкреатите ввиду тяжелого общего состояния больного. При новообразованиях результат пробы может быть очень разнообразным, в зависимости от локализации опухоли и сдавления ею протока поджелудочной железы. Количество дуоденального содержимого, полученного зондированием, обычно уменьшается, зато активность диастазы в нем увеличивается. Отмечается также переходящее увеличение концентрации бикарбонатов в дуоденальном содержимом, особенно при опухолях головки поджелудочной железы. При хронических панкреатитах количество выделяемого панкреатического сока обычно не изменяется, зато концентрация бикарбонатов в нем уменьшается. Активность диастазы также проявляет тенденцию к уменьшению. Однако все эти признаки изменчивы. Уже сам способ получения материала и неоднородность его (примеси) должны будить сомнения. В настоящее время укрепилось мнение, что секретиновая проба функции поджелудочной железы не является отчетливой и не дает того, чего мы ожидаем в диагностике этого органа.

Охотнее производится анализ панкреатических ферментов в крови и моче. При остром панкреатите концентрация ферментов действительно резко увеличивается. Так, активность амилазы исчисляется в тысячах единиц. Активность липазы в крови увеличивается всего в несколько раз (20, 21, 22). Поэтому исследование амилазы более широко распространено.

Сдавление протока поджелудочной железы на 1 час еще не приводит к повышению уровня амилазы в крови. Уровень амилазы начинает расти лишь через 2 часа. Поджелудочная железа весом в 100 грамм в состоянии освободить столько амилазы, что активность ее в крови человека весом в 70 кг может возрасти до 4000 единиц (62). Следует, однако, помнить, что есть еще и другой орган с высоким содержанием этого фермента, а именно, слюнные железы, и при паротитах также отмечается довольно большое увеличение активности амилазы в крови. Известно, что это увеличение является переходящим, длящимся 2—4 дня, и если анализ произведен слишком поздно, то его можно и не заметить. Следует также помнить, что опиаты увеличивают уровень этого фермента (8, 62) в крови, и он остается повышенным довольно

долго, а при явлениях „острого живота“ больной мог получать препараты опия перед взятием крови для анализа. При дифференциальной диагностике „острого живота“ следует помнить, что уровень амилазы может быть повышенным при заболевании так похожем по своей клинической картине к острому панкреатиту, как прободная или пенетрирующая язва желудка. Больше того, такой рост концентрации фермента может иметь место при кишечной непроходимости и внематочной беременности, травмах черепа и ожоговом или травматическом шоке, после операций на органах брюшной полости и при почечной недостаточности. Последнее встречает однако возражения некоторых авторов (50). В случаях острого панкреатита, при соблюдении мер осторожности, о которых речь была выше, эта проба является ценным дополнением диагноза, который опытный клиницист может поставить и без того.

Что касается подозрения хронического заболевания поджелудочной железы, воспалительного или опухолевого характера, то, как нам кажется, можно было бы утверждать, что в этих случаях исследование амилазы в крови и моче производят скорее традиционную, чем для реальной пользы. Вообще следует подчеркнуть, что причиной повышения амилазной активности могут являться не только органы брюшной полости, но и различные другие факторы (а именно, опиаты, демерол, кортикостероиды и другие). Тем труднее оценить небольшие колебания, так как оказалось, что то, что было принято считать нормой амилазной активности в крови, не связано с поджелудочной железой. Животному можно полностью удалить поджелудочную железу и слюнные железы, а активность амилазы в крови не исчезает и даже не уменьшается. Амилаза является очень распространенным ферментом, находящимся в клетках многих органов. Нам кажется, что регулятором уровня ее в крови скорее всего является печень. Ясно, что при таких сомнительных знаниях относительно нормы нельзя доверять изменениям, незначительно превышающим границу нормы.

Липолитическая активность крови невелика и в наилучшем случае при некоторых заболеваниях лишь в четыре раза превосходит верхнюю границу нормы. Изменения активности ее в крови сходны с изменениями активности амилазы, с той только разницей, что выражены гораздо слабей (52). Поэтому они не очень пригодны в диагностике заболеваний поджелудочной железы. Они могут иметь некоторое значение для обнаружения осложнений при заболеваниях соседних органов. Так, например, рост липемии при язвенной или желчнокаменной болезни может свидетельствовать об осложнении основного заболевания панкреатитом. При панкреатите определение этого фермента может нам помочь следить за течением заболевания. Определение липазы в моче по существу лишено какого бы то ни было значения (92), хотя еще имеет своих сторонников (93). Некоторые авторы считают более целесообразным при таких хронических заболеваниях поджелудочной железы, как рак этого органа, определять в сыворотке активность трипсина, чем амилазы или липазы (88). Однако представленный материал несубтителен.

Поскольку определение ферментов, выделяемых поджелудочной железой практически оказалось малоприменимым, возникает вопрос, не окажется ли более полезным определение клеточных ферментов, которые относятся к плазменному комплексу клеточного некроза, и которые оказали большую услугу в диагностике гепатитов. С этой целью производилось определение SGOT, SGPT, алдолазы, лактатдегидрогеназы и других. Относительно невысокое содержание трансаминаз в ткани поджелудочной железы не давало большой надежды. Результаты действительно не были ободряющими. При острых панкреатитах иногда наблюдается небольшой рост этих ферментов, причем коэффициент не превышает единицы. Уже это будит сомнение, не имел ли

место хотя бы в части случаев, сопутствующий рост ферментов печеночного происхождения (35, 44, 97). При хронических воспалительных процессах и новообразованиях поджелудочной железы уровень трансаминаз повышается редко, обычно до небольших величин, и не имеет диагностического значения.

Большой шум в последнее время вызвало предложение определения в сыворотке лейцин-аминопептидазы. Некоторые авторы (5, 13, 19, 44, 48, 124) сообщают о большой специфичности пробы. Тогда, как у здоровых людей и у других больных активность лейцин-аминопептидазы в сыворотке равна 4—54 единицам, то во всех случаях рака поджелудочной железы она отчетливо повышалась (110—210 единиц). Такой же рост наблюдается при механической желтухе от других опухолей, а также при метастатических опухолях печени. При новообразованиях в других органах без метастазов в печень активность этого фермента остается нормальной. Не отмечается также такой высокой активности при вирусном гепатите, циррозе печени, желчнокаменной болезни, даже в тех случаях, когда закупорка общего желчного протока камнем приводит к желтухе. Это был бы подающий надежды тест, особенно на злокачественные опухоли поджелудочной железы. К сожалению другие авторы не подтвердили этой точки зрения (2, 54, 55, 130). Не отрицая явления повышения активности этого фермента в некоторых случаях, они доказывают, что этот рост не берет своего начала ни из панкреатической ткани, ни из опухолевой. Поэтому они не видят основания к тому, чтобы этот тест являлся специфическим для поджелудочной железы или для ее опухоли. Не обнаружено также, чтобы желчь была особенно богата этим ферментом, что могло бы являться обоснованием роста активности этого фермента в крови при механической желтухе. На материале больных, не меньшем, чем у сторонников метода, они показывают, что эта проба может быть положительной, сомнительной или отрицательной у больных раком поджелудочной железы, а также что у значительного количества больных без опухоли поджелудочной железы можно встретить повышение активности лейцин-аминопептидазы того же порядка, что и при опухолях. Таким образом, наши сведения об этом ферменте, изменениях его концентрации и происхождении следует считать еще недостаточными, а практическое значение пробы сомнительным и нуждающимся в дальнейшем изучении. Что касается пептидазы, то опыт нашей клиники показывает, что большие надежды при заболеваниях поджелудочной железы можно возлагать на определение γ -глутамилтранспептидазы.

В эксперименте на разных животных замечено, что при некрозе поджелудочной железы, вызванном вирусом Coxsackie или перевязкой протока, отмечается рост активности дезоксирибонуклеазы в сыворотке. У больных с острым геморрагическим панкреатитом отмечался такой же значительный и длительный рост активности этого фермента в сыворотке (73, 109). Методика определения фермента требует наличия спектрофотометра и трудно доступного реактива.

Ввиду того, что определение одного какого-либо фермента для диагностики хронического заболевания поджелудочной железы является недостаточным, предложено производить 3 функциональные пробы, которые производят не только *in vitro*, но и внутри организма. Речь идет о реакции на панкреозимин и секретин; пробу с нагрузкой крахмалом и пробу с триолеинатом, меченым J^{131} . Принципы первой пробы мы уже привели. Другая заключается в сравнении нагрузки отдельно на 100 г глюкозы и на 100 г крахмала. Отношение рассчитывают по формуле

$$\frac{(P' - F' - (P - F))}{(P - F)} \times 10 = X,$$

где Р обозначает вершину гликемической кривой после глюкозы, F — уровень натощак, Р' — вершину гликемии после крахмала, а F' — соответствующий уровень натощак. Если $X > 100$, то результат является положительным, величины 70—100 считаются пограничными. Проба с радиоактивным триолеином заключается в том, что больной натощак принимает капсулку, содержащую ^{131}I , после чего собирают пробы кала и без гомогенизации определяют их радиоактивность, в сравнении с образцом. В этом комплексе проб мы имеем, таким образом, пробу выделения панкреатического сока после физиологического раздражителя, пробу на внутрикишечную активность амилазы и липазы (эти последние, к сожалению, вместе с одновременным всасыванием, которое может являться отдельной неизвестной). Поэтому и после этого нововведения мы не ожидаем решительного улучшения плохих результатов диагностики заболеваний поджелудочной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alldis D.: Serum transaminases — diagnostic and prognostic value in liver disease, Gigon u. Ludwig: Enzymatische Regulationen in der Klinik, B. Schwabe & Co. Basel, 1960, 194. — 2. Arst H. E., Manning R. T., Delp M.: Am. J. Med. Sci. 1959, 238, 120. — 3. Bang N. U., Iversen K., Jagt T., Madsen S.: J. A. M. A. 1958, 168, 156. — 4. Bang N. U., Rueggsegger P., Ley A. B., La Due J. S.: J. A. M. A. 1959, 171, 2303. — 5. Banks B. M., Pineda E. P., Goldbarg J. A., Rutenburg A. M.: New Engl. J. Med. 1960, 263. — 6. Baranowski T., Gibiński K.: Clinical application of hydrolisate of adrenocorticotrophic hormone, Bull. Acad. Pol. Sc. Lett. Classe Méd. 1953. — 7. Barondess J. A., Erle H.: Amer. J. Med. 1960, 29, 43. — 8. Berk J. E., Harris H., Pringle B.: Gastroenterology, 1960, 39, 702. — 9. Beyreder J., Rettenbacher-Däubner H.: Wien. Klin. Wschr. 1959, 71, 686. — 10. Bickel G.: Rév. Méd. Suisse Rom. 1951, 71, 14. — 11. Bing R. J., Castellano A., Siegel A.: J. A. M. A. 1957, 164, 647. — 12. Bonati B., Lacerenza C., Raucati G. B., Tenconi L. T.: Minerva Med. 1956, II. — 13. Braun P., Papp M., Németh E. P., Horvath I.: Gastroenterologia, 1961, 95, 57. — 14. Bruns T., Puls W.: Klin. Wschr. 1954, 32, 656. — 15. Buys Ballot A. F. K., Terlinger J. B. A.: Klin. Wschr. 1960, 38, 180. — 16. Cesnik H.: Wien. Klin. Wschr. 1958, 70, 930. — 17. Cesnik H.: Langenbecks, Arch. Klin. Chir. 1959, 293, 1. — 18. Chinsky M., Schmagranoff G., Sherry S.: J. Lab. Clin. Med. 1956, 47, 108. — 19. Chinsky M., Wolff J., Sherry S.: Am. J. Med. Sci. 1957, 233, 400. — 20. Chojecki Z.: P. Arch. Med. Wewn. 1956, 26, 1. — 21. Chojecki Z.: P. Arch. Med. Wewn. 1956, 26, 161. — 22. Chojecki Z.: P. Arch. Med. Wewn. 1956, 26, 319. — 23. Chojecki Z., Kern F.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1961, 31, 147. — 24. Colbert J., Holland J., Knowland M.: The Use of ACTH in acute viral hepatitis. Proceedings of the Second Clinical ACTH Conference Philadelphia 1951, 1, 381. — 25. Czyżyk A.: P. Arch. Med. Wewn. 1954, 24, 305. — 26. Demeulenaere L.: Die GO und GP-transaminasaemie in den Krankheiten des Leber-Gallensystem. Symposium Europeo di Enzimologia Medica, Milano, 28—29. III. 1960, Vorträge, Boehringer, Milano 1960. — 27. Ducci H., Katz R.: Gastroenterology 1952, 21, 357. — 28. Dumańska K., Kownacki S.: Pol. Tyg. Lek. 1957, 12, 1194. — 29. Editorial: Brit. Med. J. 1958, II, 1523. — 30. Fiesinger N., Albeau-Fernet M., Gajdos A.: Ann. de Méd. 1934, 34, 101. — 31. Fiesinger N., Gajdos A.: Ann. de Méd. 1935, 38, 405. — 32. Florkiewicz H.: Pol. Tyg. Lek. 1959, 14, 1425. — 33. Forster G.: Bull. Schweiz. Ak. Med. Wissensch. 1958, 14, 191. — 34. Forster G.: 1-phosphofructaldolase und Sorbit-Dehydrogenase als Leberspezifische Leberenzyme. 6-Congress Int. Med. Basle, 24—27. VIII. 1960. (Handbook). — 35. Foulk W. T., Fleisher G. A.: Gastroenterology. 1958, 35, 375. — 36. Fragge R. G., Kopel F. B., Iglauer A.: Ann. Int. Med. 1960, 52, 1042. — 37. Friend Ch., Wróblewski F., La Due J. S.: J. Exp. Med. 1955, 102, 699. — 38. Fucik M., Rousky R., Skála I.: Gastroenterologia 1960, 93, 79. — 39. Gailitis R. J., Schreiber W.: Am. J. Dig. Dis. 1960, 5, 473. — 40. Gibiński K., Kokot F.: Pol. Tyg. Lek. 1957, 12, 1841. — 41. Gibiński K., Baranowski T., Bodganikowa B., Mejbaum-Katzenellenbogen W., Kowal B.: Pol. Tyg. Lek. 1952, 7, 997. — 42. Gibiński K., Baranowski T., Mejbaum-Katzenellenbogen W., Bodganikowa B., Kowal B.: Sprawozdanie Wrocław. Tow. Nauk. 1952, 7, dod. 3. — 43. Gibiński K.: Pol. Tyg. Lek. 1954, 9, 673. — 44. Gibiński K.: Przegl. Lek. 1957, 13, 262. — 45. Gibiński K.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 1323. — 46. Gibiński K., Derus-Nowosielecka E., Żmudziński J., Kokot F., Maraszek J.: The prednisone treatment of the viral hepatitis in the light of enzymologic investigations. Proceedings of the International Congress of Gastroenterology, Leyden 1960, Excerpta Med. Amsterdam 1961, 343. — 47. Giusti G., Coltorti M., Cirillo C.: Giorn. Mal. Inf. Parass. 1959, 11, 106. — 48. Goldberg J. A., Rutenburg A. M.: Cancer N. Y. 1958, 11, 283. — 49. Gray

- C. H.: *Simposium Europeo di Enzimologia Medica*, Milano 1960. — 50. Gross J. B., Parkin F. W., Maker F. T., Power M. H.: *Gastroenterology* 1960, 39, 76.
51. Grott J. W., Stachurska-Torzecka W.: *Pol. Tyg. Lek.* 1955, 10, 1137. — 52. Grott J. W., Stachurska-Torzecka W.: *Pol. Tyg. Lek.* 1955, 10, 1169. — 53. Gutman A. B.: *Am. J. Med.* 1959, 27, 875. — 54. Hammond J. B., Rosenak B. D., Khor E. C.: *Am. J. Dig. Dis.* 1960, N. S., 5, 233. — 55. Harkness J., Roper B. W., Durant J. A., Miller H.: *Brit. Med. J.* 1960, I, 1787. — 56. Hauss W. H., Leppelmann H. J.: *Klin. Wschr.* 1957, 35, 65. — 57. Haus W. H., Leppelmann H. J.: *Klin. Wschr.* 1957, 35, 71. — 58. Hed R., Von Reis G.: *Acta Med. Scand.* 1959, 165, 431. — 59. Hess B.: *Simposium Europeo di Enzimologia Medica*, Milano, 1960. Vorträge, Boehringer, Milano, 1960, Minerva Medica 1960, 51, 934. — 60. Horn H. D., Amelung D.: *Dtsch. Med. Wschr.* 1957, 82, 619.
61. Hsieh K. M., Blumenthal H. T.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956, 91, 626. — 62. Idelson L. I.: *Terap. Arch.* 1958, 30/2, 52. — 63. Janowitz H. D., Dreiling D. A.: *Am. J. Med.* 1959, 27, 924. — 64. Jonderko G.: *Pol. Tyg. Lek.* 1957, 12, 1500. — 65. Jonderko G.: *P. Arch. Med. Wewn.* 1958, 28, 1101. — 66. Jonderko G.: *P. Arch. Med. Wewn.* 1961, 31, 21. — 67. Kamenik A., Prokopowa W., Towarek J.: *Pol. Tyg. Lek.* 1958, 13, 981. — 68. Kaniak J., Orłowski M., Janikowski R.: *Przegl. Lek.* 1958, 14, 259. — 69. Karmen A., Wróblewski F., La Due J. S.: *J. Clin. Investig.* 1955, 34, 126. — 70. Keiderling W., Westphal O., Lüderitz O.: *Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss.* 1952, 8, 100.
71. Kędra M., Markiewicz M.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* 1959, 29, 1479. — 72. Killip T., Rayne M. A.: *Circulation*; 1960, 21, 643. — 73. Kowlessar O. D., Mc Evoy R. K.: *J. Clin. Investig.* 1956, 35, 1325. — 74. Krawczyński J., Krystosik J.: *Pol. Tyg. Lek.* 1955, 10, 1058. — 75. Lapis J., Mandat A., Rychlik H., Szymańska H.: *P. Arch. Med. Wewn.* 1961, 31, 337. — 76. Latner A. L., Smith A. J.: *Lancet*; 1958, II, 915. — 77. Lewitan R., Golub M., Zetzel M.: *Amer. J. Dig. Dis.* 1960, 5, 458. — 78. Makoto Okumara, Spellberg M.: *Gastroenterology* 1960, 39, 305. — 79. Manso C., Faranta A., Nydick I.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1956, 93, 84. — 80. Manso C., Wróblewski F.: *J. Clin. Invest.* 1958, 37, 214.
81. Markoff N., Allgöwer M.: *Schw. Med. Wschr.* 1957, 87, 1265. — 82. Merrill J. H. и соавт.: *J. A. M. A.* 1956, 160, 1454. — 83. Miller A. L., Worsley L. R.: *Lancet*, 1960, I, 702. — 84. Molander D. W., Sheppard E., Payne M. A.: *J. A. M. A.* 1957, 163, 1461. — 85. Molander D. W., Wróblewski F., La Due J. S.: *J. Labor. Clin. Med.* 1955, 46, 831. — 86. Moretti G. F., Staeffen J., Ballan P., Demange G., Rousseau J.: *Presse Med.* 1960, 68, 2278. — 87. Mosley J. W., Dull H. B., Doege T. C., Kuykendall H. D.: *Gastroenterology*, 1961, 41, 9. — 88. Nardi G. L.: *Gastroenterology*; 1960, 38, 50. — 89. Nowak St.: *Pol. Tyg. Lek.* 1961, 16, 1481. — 90. Nowak St.: *Pol. Tyg. Lek.* 1961, 16, 1441.
91. Nowosielecka E., Herman Z., Gibiński K.: *Pol. Tyg. Lek.* 1962, 17, 906. — 92. Nothman M., Pratt J., Callow A.: *Arch. Int. Med.* 1957, 100, 221. — 93. Nothman M., Callow A.: *Arch. Int. Med.* 1959, 104, 568. — 94. Orłowski M., Kotlarek-Haus S.: *Pol. Tyg. Lek.* 1958, 13, 1913. — 95. Orłowski M.: *Pol. Tyg. Lek.* 1958, 13, 588. — 96. Orłowski M., Szewczuk A.: *Clin. Chim. Acta*, 1960, 6, 430. — 97. Pajer J., Ninger E., Martinek K., Towarek J.: *Gastroenterologia*, 1961, 95, 73. — 98. Pineda E. J., Goldberg J. A., Banks B. M., Rutenburg A.: *Gastroenterology*, 1959, 36, 202. — 99. Покровский А. А.: *Вопросы медицинской химии*, 1960, 6, 228. — 100. Poznańska H.: *P. Arch. Med. Wewn.*, 1955, 25, 587.
101. Pryce-Davies J., Wilkinson J.: *Lancet*; 1958, I, 1249. — 102. Rafalowicz A., Müller J., Soldaj H., Wolańska A.: *Pol. Tyg. Lek.* 1959, 14, 4. — 103. Rapczewski J.: *Pol. Tyg. Lek.*, 1959, 14, 543. — 104. De Ritis F., Coltorti M., Giusti M.: *Minerva Med.* 1955, 46, 1207. — 105. De Ritis F., Coltorti M., Giusti M.: *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1955, 31, 394. — 106. De Ritis F., Coltorti F., Giusti G.: *Science*; 1956, 124, 32. — 107. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1956, 32, 1555. — 108. De Ritis F., Giusti G., Coltorti M.: *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1956, 32, 1. — 109. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1956, 32, 1. — 110. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *J. Inf. Dis.* 1957, 101, 219.
111. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *Gior. Mal. Inf. Paras.* 1957, 9, 3. — 112. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *Bull. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1956, 32, 1557. — 113. De Ritis F., Giusti G., Coltorti M.: *Min. Med.* 1957, 48/36, 3. — 114. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *The Lancet* 1958, II, 214. — 115. De Ritis F., Mallucci L., Coltorti M., Giusti G., Caldera M.: *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1959, 20, 589. — 116. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *Recenti Progressi in Medicina*. 1956, 20, 533. — 117. De Ritis F., Ascione A., Coltorti M., Giusti G., Mallucci L.: *Giorn. Mal. Infett. Paras.*, 1959, 11, 3. — 118. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *Minerva Medica* 1960, 51, 932. — 119. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: *Simposium Europeo di Enzimologia Medica*, Milano, 28—29. III. 1960; Vorträge, Boehringer, Milano 1960. — 120. Rogers F. A.: *California Med.*, 1960, 93, 6.
121. Rogers F. A.: *Ann. Surg.* 1961, 153, 228. — 122. Ronsky R., Skala I., Burianek J., Jabłowska M.: *Gastroenterologia*, 1959, 91, 71. — 123. Rudnicka J.: *Zachowanie się niektórych enzymów surowicy krwi w doświadczalnym zatruciu metanolem*. Диссертация. Wrocław 1961. — 124. Rutenburg A. M., Goldberg J. A., Pineda E. P.: *New Engl. J. Med.* 1958, 259, 469. — 125. Sahli H.: *Lehrbuch des klinischen Untersuchungsmethoden*. I. Leipzig-Wien 1913, 614 —

626. — 126. Sborow V.: Discussion. Proceedings of the Second Clinical ACTH Conference, Philadelphia 1951, I, 381. — 127. Schenker S.: Amer. J. Digest. Dis. 1959, 4, 412. — 128. Schwarzmann M. V.: Arch. Mal. App. Dig., 1957, 46, 11. — 129. Shay H., Siple H.: Gastroenterology, 1957, 32, 571. — 130. Shay H., Sun D. C. H., Siple H.: Am. J. Dig. Dis. 1960, N. S-5, 217. — 131. Shay H., Sun D. C. H., Yoon Chey Woo, Oleary D.: Am. J. Dig. Dis. 1961, N. S., 6, 142. — 132. Smith M. J. H.: Symposium Europeo di Enzymologia Medica, Milano 1960, Vorträge, Boehringer, Milano 1960. — 133. Smith M. J. M.: Variation in blood enzyme activities in liver disease. 6. Congr. Int. Med. Basle 24—27. VIII. 1960 в Gigon, Ludwig: Enzymatische Regulationen in der Klinik. B. Schwabe, Basel, 1960. — 134. Sommerville R. L., Fleisher G. A., Dearing W. H., Hallenbeek G. A., Dackerty M. B.: Gastroenterology, 1960, 30, 926. — 135. Szczeklik E., Orłowski M., Szewczuk A., Kołaczowska B.: Serum gamma-glutamyl peptidase activity as a new enzymatic test in liver diseases. Proceedings of the International Congress of Gastroenterology, Leyden 1960. Excerpta Medica, Amsterdam 1961. — 136. Szczeklik E., Orłowski M., Szewczuk A.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 503. — 137. Taylor A., Taylor K., Uhl W., Osińska-Chimiak M.: Biul. Inst. Med. Mors., 1957, 8, 9. — 138. Tolentino P., Rossi M.: G. Mal. Infett. 1957, 9, 552. — 139. Tolentino P., Rossi M.: Minerva Pediat. 1957, 9, 337. — 140. Varró V., Faredin I., Novoszel F.: Acta Med. Scand. 1955, 153, 211. — 141. Varró D., Faredin I., Czernay L.: Am. J. Dig. Dis. 1960, 5, 466. — 142. Vienne R. J., Demeulenaere L.: Acta Gastro-Ent. Belg. 1959, 22, 69. — 143. Villa L.: Discours inaugural au Symposium Europeen d'Enzymologie Médicale; Milano, 28—29. III. 1960. — 144. Villa L.: Enzymatic regulation of the liver. 6 Intern. Congr. Int. Med. Basle 24—27 Aug. 1960. в Gigon u. Ludwig: Enzymatische Regulationen in der Klinik B. Schwabe, Basle, 1961. — 145. West M., Gelb D., Zimmerman H. J.: Am. J. Med. Sci. 1961, 241, 350. — 146. Wróblewski F., La Due J. S.: J. Lab. Clin. Med. 1954, 44, 958. — 147. Wróblewski F., La Due J. S.: Ann. Int. Med. 1955, 43, 345. — 148. Wróblewski F., Jervis G., La Due J. S.: Ann. Int. Med., 1956, 45, 782. — 149. Wróblewski F., Friend C., Nydick I., Rueggsegger P., La Due J. S.: J. Clin. Investig. 1956, 35, 746. — 150. Wróblewski F., La Due J. S.: Ann. Int. Med. 1956, 45, 801. — 151. Wróblewski F., La Due J. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, 91, 569. — 152. Wróblewski F., Manso C.: J. A. M. A. 1958, 167, 2169. — 153. Wróblewski F.: Am. J. Med. 1959, 27, 911. — 154. Wróblewski F.: The clinical implication of plasma coenzymes. 6 Congr. Int. Med. Basle 24—27. VIII. 1960. (Handbook).

ЗАБОЛЕВАНИЯ ОРГАНОВ КРОВЕТВОРЕНИЯ

EDWARD SZCZEKLIK I ALINA JANIAKOWA

ФЕРМЕНТНЫЕ РАССТРОЙСТВА ЭРИТРОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЫ

ФЕРМЕНТНЫЕ РАССТРОЙСТВА И ИЗМЕНЕНИЯ СИНТЕЗА ГЕМОГЛОБИНА

Гемоглобин является молекулой, состоящей из 4 гемов и 1 белковой молекулы глобина, с молекулярной массой примерно 66000. Гем, который придает гемоглобину характерную окраску, состоит из 1 атома железа, вмонтированного в середину 4 пироловых колец, со структурой порфирина.

Каждая молекула глобина состоит из 2 пар полипептидных цепей, а именно α и β цепей, которые находятся в определенных пространственных взаимоотношениях. Группа гема находится между двумя петлями полипептидных цепей и при помощи гистидиновой группы связана с одной из этих цепей.

У взрослого человека имеется 4 вида гемоглобина: A_1 , A_2 , A_3 и эмбриональный гемоглобин F. Основной составной частью гемоглобина (Hb) у взрослого человека является Hb A_1 . Hb A_2 составляет 2%, Hb A_3 — примерно 10% и эмбриональный гемоглобин около 1/2% всего гемоглобина.

β цепи эмбрионального гемоглобина называются γ цепями. Они отличаются от β цепей Hb A_1 . β цепи Hb A_1 отличаются от β цепей Hb A_2 ; эти последние называются также Δ цепями.

Несмотря на то, что молекулярное строение четырех видов Hb хорошо изучено, их физиологическое значение остается неясным. Hb A_1 , A_2 и F имеют те же самые α цепи, только β цепи их отличаются друг от друга разным

составом аминокислот. У нормальных людей в крови имеется 3 вышеперечисленных вида гемоглобина, синтез которых зависит от собственных генов. Количество Hb A₂ увеличивается в пожилом возрасте. Количественное взаимоотношение отдельных видов Hb зависит от возраста и от наследственных факторов; оно не зависит от перенесенных заболеваний.

У плода в первую очередь образуется эмбриональный гемоглобин, затем Hb A₁ и Hb A₂. Количество Hb A₁ увеличивается перед рождением ребенка; после рождения уменьшается количество эмбрионального Hb. Наибольшее количество Hb F имеется при талассемии — *thalassaemia major*. Наименьшее количество Hb F встречается при серповидно-клеточной и других видах наследственной анемии, при которой имеется наследственное расстройство синтеза зрелого Hb. Hb F может существовать одновременно с Hb A и с неправильными видами Hb у некоторых людей. Место образования эмбрионального гемоглобина, которое обычно не функционирует у взрослых, остается активным, если синтез нормального зрелого Hb расстроен.

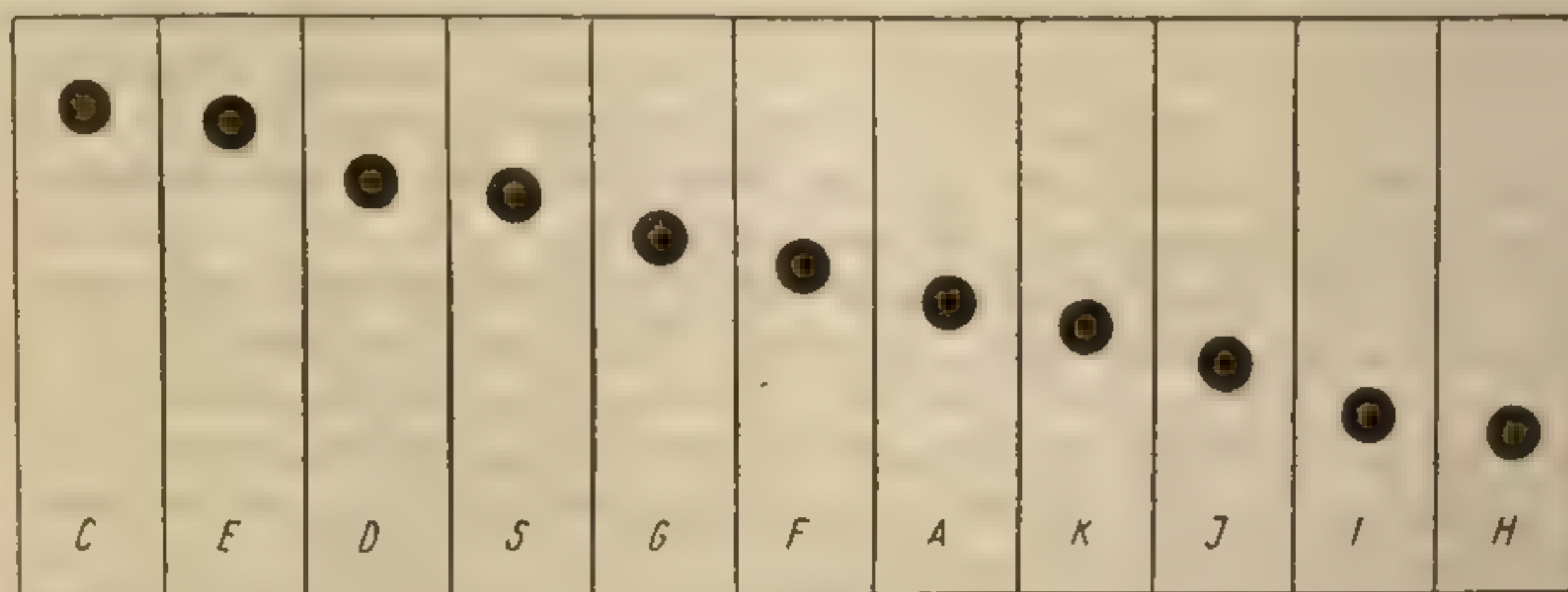


Рис. 63. Схема разделения различных фракций гемоглобина при хроматографии на бумаге.

Расстройства синтеза Hb могут иметь место во всех 4 цепях. Чаще всего встречаются расстройства синтеза в β цепи. Сюда относятся патологические формы Hb S, C, E. Отклонения Hb S и C касаются пептида 4 в β цепи. В этой цепи глутаминовая кислота в Hb S замещена валином, а в Hb C — лизином. В Hb E отклонения имеют место в пептиде 26, в котором глутаминовая кислота замещена лизином. С генетической точки зрения гены Hb S и C являются множественными аллелями. Гены Hb E ведут себя, как множественный аллель гена Hb S.

Расстройства синтеза α цепи касаются Hb A₁, A₂ и F. Сюда относятся Hb I и D α .

Расстройства γ цепи эмбрионального Hb можно обнаружить в крови, взятой из пуповины непосредственно после родов. Сюда относится Hb Fessas и Aleksander.

Наконец, при гемоглобинопатии, называемой талассемией, не обнаружено расстройств синтеза Hb, но имеет место резкое снижение синтеза Hb A₁, или он совершенно отсутствует, а количество эмбрионального Hb резко повышено.

Патологические признаки Hb можно выявить при электрофорезе на бумаге или на ионообменных смолах. Измененная молекула Hb образуется под влиянием мутации гена. Эти гены названы генами неправильного Hb.

Благодаря улучшенной технике исследования, количество выявленных патологических форм гемоглобина в последнее время так резко увеличилось, что некоторые из них обозначаются не буквами алфавита, а согласно местности,

где они были обнаружены (например, Hb Zurich). Этот недавно обнаруженный Hitzig и сотрудниками (32) неправильный Hb не дает патологических симптомов. Тем не менее у двух членов семьи, у которых обнаружен этот вид гемоглобина, после приема сульфонамидов появились опасные для жизни гемолитические кризы.

Расстройств в функции транспорта кислорода и двуокиси углерода патологическими формами гемоглобина не отмечается, так как генетические изменения касаются глобина, а не гема. Но патологические формы гемоглобина сокращают длительность жизни эритроцитов и поэтому могут являться одной из причин анемии.

Гемоглобин S при серповидноклеточной анемии встречается почти исключительно у негров, у некоторых племен почти в 30%. Установлено, что молекулы Hb S диссоциируют асимметрично, и что специфическая аномалия Hb S заключается в понижении растворимости его в редуцированном состоянии. Ферментный дефект заключается в том, что Hb S вместо глутаминовой кислоты содержит валин; это ведет к расстройству фосфорилирования.

Эпидемиологические исследования последних лет показали, что негры с гемоглобином S менее восприимчивы к малярии, чем негры с нормальным гемоглобином. Таким образом Hb S создает худшие условия развития для паразита малярии, находящегося в эритроците, и поэтому в некоторой степени является защитным фактором против малярии.

Клетки, которые содержат Hb S, могут принимать серповидную форму при низком парциальном давлении кислорода. Hb S может привести к анемии, если существуют другие факторы, обуславливающие ее появление. К последним относятся: соотношение патологического Hb S и нормального Hb A, одновременное наличие другой патологической формы Hb, а также активность компенсаторного эритропоэза.

Неспособность клетки с поврежденным или измененным геном к продукции нормального гемоглобина может привести к увеличению количества патологического Hb. Например, при серповидноклеточной анемии увеличение синтеза патологического Hb S, как и торможение синтеза нормального Hb A, регулируются в клетке тем же самым геном. Компенсаторным усилием клетки является увеличенная продукция Hb S с целью компенсации дефицита Hb A и достаточного снабжения клетки гемоглобином.

Серповидноклеточная анемия является хронической врожденной гемолитической анемией, зависящей от наличия в эритроците Hb S. Оба родителя ребенка, страдающего анемией, являются носителями признака S; ребенок имеет два гена S. При явной серповидноклеточной анемии нормального Hb A не бывает, имеется только комбинация Hb F и Hb S. Заболевание встречается у американских негров, иногда у мулатов.

У больных (гомозиготы SSHb) отмечается постоянная умеренная анемия с увеличенным количеством ретикулоцитов и с мишеневидными клетками. Умеренная билирубинемия. В процессе заболевания появляются кризы с повышением температуры и болями в конечностях и брюшной полости, а также лейкоцитоз. Иногда наблюдается расширение сердца. Тромбозы и инфаркты во внутренних органах вносят разнообразие в клиническую картину данного заболевания. Больные обычно умирают не дожив 10 летнего возраста, редко доживают до 40 лет.

Диагноз подтверждает серповидная форма эритроцитов. Чаще всего пользуются следующим тестом: каплю крови больного смешивают с 2% пиросульфитом натрия на предметном стекле. Через 15 минут эритроциты приобретают серповидную форму. Электрофоретический анализ подтверждает наличие Hb S.

При легкой форме (гетерозиготы) серповидноклеточная анемия протекает латентно, проявляется как носительство. В этих случаях рядом с Hb S имеется Hb A. Гетерозиготы S A составляют 7—9% американских негров.

Гемоглобин C может встречаться 1) в гомозиготной форме у особей с 2 генами Hb C. Гемолитическая болезнь, которая при этом имеет место, протекает доброкачественно; спленэктомия не оказывает решающего влияния на течение заболевания. Заболевание встречается у негров; 2) в гетерозиготной форме, при которой рядом с Hb C имеется нормальный Hb A.

Ген Hb C может также встречаться в сочетании с геном Hb S, вызывая серповидноклеточную анемию, Hb C. Известны также сочетания Hb C с одним из генов талассемии. Сочетание Hb C и A протекает бессимптомно и касается носителей признака Hb C.

Hb E встречается у детей с так называемой нетипичной анемией и склонностью к гемолизу. Это доброкачественный гемолитический симптомокомплекс.

Hb D встречается при гемолитических состояниях, при которых не отмечается серповидности эритроцитов. В электрофоретическом поле перемещается также, как гемоглобин S. Встречается у американских индейцев, негров в Африке, Алжирцев и Турков.

Hb I как и Hb D встречается редко. Гемоглобин H состоит из 4 β цепей и его иногда можно обнаружить у носителей гена талассемии. Гемоглобин Bartholomews содержит 4 γ цепи, встречается у новорожденных — носителей гена талассемии. Перечисленные формы гемоглобина состоят, таким образом, из четырех одинаковых цепей. Такие связи возможны между β и γ цепями, но невозможны между α цепями.

Талассемия или анемия Кули. При электрофорезе патологических форм гемоглобина не обнаруживается, но отмечается резкое увеличение количества эмбрионального Hb у взрослых, иногда до 90%, при уменьшении количества Hb A, иногда даже при полном отсутствии его. Кроме того увеличивается количество Hb A₂, который, однако, при африканской талассемии может отсутствовать. Увеличенное количество Hb A₂ как и эмбрионального гемоглобина заставляет предполагать, что расстройство может касаться образования β цепей. При этом могут иметь место две возможности: или синтез цепей происходит нормально, но слишком медленно, или же существует не обнаруженное до настоящего времени расстройство в синтезе β цепей (34).

Талассемия встречается у белых жителей побережья Средиземного моря, в некоторых районах Азии и Африки, там, где встречается эндемически малярия. Различаются две формы:

1. *Thalassaemia major* у гомозигот; в этих случаях оба родителя являются носителями гена талассемии. Заболевание имеет место у каждого четвертого ребенка таких родителей и обычно приводит к смерти в детском возрасте. Анемия является гемолитической, микроцитарной, гипохромной. Количество ретикулоцитов увеличено; встречаются мишеневидные эритроциты. Осмотическая резистентность эритроцитов снижена. Количество эритробластов в костном мозге увеличено. Отмечается лейкоцитоз и гранулоцитоз. Количество гемоглобина в крови и уробилиногена в моче увеличено. Печень и селезенка иногда увеличены. Лицо имеет монголоидное выражение, голова большая, череп деформирован (остеопороз). Иногда наступают гемолитические кризы.

2. *Thalassaemia minor* встречается у гетерозигот, то есть у лиц с одним геном талассемии. У больных, страдающих этой формой заболевания, процент эмбрионального гемоглобина является более низким, чем в предыдущей форме. Клиническая картина и течение заболевания более легкое, так что больные доживают до зрелого возраста. Иногда, однако, трудно различить эти две

формы. Некоторые авторы предполагают, что имеется не один ген талассемии, а несколько генов, чем объясняют разные степени тяжести заболевания.

Кроме того имеются синдромы, сходные с талассемией, при которых, кроме генов талассемии встречаются также гемоглобин G и S. Описаны случаи комбинации генов Hb F с обоими генами Hb S и C, в виде комбинации генов SF и CF. Установлено, что ген F является ответственным за наследственное наличие эмбрионального гемоглобина, и локализуется там же, где гены S и C, а также гены классической талассемии. Таким образом они являются аллельными формами генов.

Увеличенное количество эмбрионального гемоглобина обнаружено при анемии Фанкони (34).

ВРОЖДЕННЫЕ ФЕРМЕНТНЫЕ РАССТРОЙСТВА СИНТЕЗА НОРМАЛЬНОГО ГЕМОГЛОБИНА, СВЯЗАННЫЕ С ГЕМОМ

Врожденная метгемоглобинемия характеризуется патологическим накоплением в крови метгемоглобина, в результате того, что трехвалентное железо метгемоглобина неспособно к редукции и к окислению в двухвалентное железо гемоглобина. В физиологических условиях метгемоглобин составляет меньше, чем 1% пигмента крови; при этом заболевании может достигнуть до 30%.

Различают два вида врожденной метгемоглобинемии:

1. В одной группе больных имеется дефицит кофермента фактора I (флавопротенин, диафораза, липоамиддегидрогеназа). Этот фермент необходим для процесса ферментативного превращения метгемоглобина в гемоглобин; катализатором его является метгемоглобинредуктаза. Этот процесс заключается в надлежащем использовании глюкозы или лактата и требует достаточного количества редуцированного дифосфоинридиннуклеотида (НАД·H₂). При спектральном анализе отмечается большое количество метгемоглобина.

2. У больных другой группы имеется патологический гемоглобин M, который можно обнаружить в спектре поглощения и на основании неправильного перемещения при электрофорезе. Он легче окисляется, чем другие формы патологического гемоглобина и при спектральном анализе не отмечается увеличения количества его в зоне метгемоглобина.

В этих случаях у новорожденных или у детей раннего возраста имеется значительный цианоз, с которым связана значительная гипоксия и расстройство функции тканей. Отсутствуют симптомы врожденного порока сердца, пальцы в виде барабанных палочек, изменения в легких и так далее. Длительное применение метиленовой синьки устраняет цианоз и связанные с ним симптомы, как, например, головные боли.

Расстройства метаболизма порфирина подробно рассмотрены в отдельной главе. Они относятся к расстройствам в системе ферментов, регулирующих образование эритроцитарного порфирина. В этом процессе принимают участие 3 системы ферментов. Первая система связана с трикарбоксильным циклом; катализирует реакцию активной янтарной кислоты и глицина, в результате которой образуется Δ -аминолевулиновая кислота. Вторая группа ферментов отвечает за трансформацию Δ -аминолевулиновой кислоты в порфобилиноген. Третья система ферментов преобразует порфобилиноген в протопорфирин. Гем образуется путем введения атомов железа (65).

В результате расстройства обменного ферментативного механизма образуется порфирин. Согласно Watson (1960) порфирии можно разделить на:

- 1) *porphyria erythropoietica*
- 2) *porphyria hepatica* (69).

1. *Porphyria erythropoietica*, или *porphyria congenita*, согласно Guenther является генетически обусловленным заболеванием, которое характеризуется чрезмерным патологическим образованием порфирина в эритроцитах, развивающихся в костном мозге. Образование порфирина начинается в ядре нормобласта и количество его превышает содержание порфирина в печени.

К наиболее ранним симптомам этого заболевания относятся кожные симптомы — под влиянием света могут появляться пузыри (*hydroe aestivale*). Светобоязнь проявляется уже в детстве и со временем может довести до обширного повреждения кожи со вторичной инфекцией и специфическими изменениями лица и рук. Зубы иногда имеют характерный красный или краснокоричневый цвет. Гемолитическая анемия может появиться в любом возрасте. Костный мозг имеет характер гипербластического или нормобластического. Нормобласты содержат большое количество уро- и копропорфирина I, также, как эритроциты и селезенка. В моче, обычно красного цвета, также имеется большое количество про- и копропорфирина I, а в кале наоборот. В некоторых случаях удаление увеличенной селезенки может дать немедленное улучшение.

2. *Porphyria hepatica*. Синтез порфирина происходит не только в костном мозге, но и в печени, в связи с образованием цитохрома, каталазы и других ферментов гема. Синтез происходит таким же образом, как и в костном мозге. Эту форму порфирии характеризует усиленное и патологическое образование порфиринов в печени. При экспериментальной порфирии печеночного типа обнаружено прогрессивное уменьшение синтеза каталазы в печени.

Печеночную форму Watson делит на следующие подгруппы:

а) острая интермиттирующая форма. Характеризуется приступами, длящимися двое суток и больше, с ремиссиями, более или менее длительными. Во время приступов имеют место симптомы со стороны органов брюшной полости и нервной системы. Приступы могут быть вызваны различными химическими веществами, особенно барбитуратами, сульфоналом, седормидом, эрготамином, хлорохином и другими. Иногда приступы появляются после злоупотребления алкоголем или под влиянием психического шока. Боли в брюшной полости носят коликообразный характер, и их нередко приходится дифференцировать с острым аппендицитом, почечной и печеночной коликой, прободной язвой желудка. Однако температура не повышается, лейкоцитоза не бывает, живот мягкий, стул задержан.

Неврологические симптомы могут быть со стороны периферических нервов, бульбарные, или со стороны вегетативной нервной системы. Могут появиться также психические симптомы. Поведение больного иногда напоминает истерический припадок, иногда появляются эпилептиформные судороги. В моче можно обнаружить Δ-аминолевулиновую кислоту, копропорфирин III и уропорфирин I. С мочой выделяется также порфобилиноген.

б) поздняя кожная форма (*porphyria cutanea tarda*). Кожные изменения, которые имеют место при этой форме, выражены меньше, чем при эритропоэтической порфирии, и обычно появляются после 40 летнего возраста. Часто имеют место расстройства со стороны печени, в моче имеется большое количество порфирина, в кале — копропорфирин. Порфобилиногена в моче не бывает.

в) смешанная форма. Кроме симптомов со стороны брюшной полости, нервной системы и кожных, могут появляться печеночные симптомы, которые выдвигаются на первый план. Иногда отмечается желтуха, может иметь место цирроз печени. В анамнезе часто алкоголизм. Наступают расстройства функции печени. В моче имеется уропорфирин I и копропорфирин III; порфобилиногена обычно не бывает, но в случаях с нервными и брюшными симптомами может быть.

ФЕРМЕНТНЫЕ РАССТРОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ

Особое строение эритроцита — безъядерной клетки — обуславливает ее метаболизм, почти исключительно зависящий от бескислородного гликолиза. В эритроците сохранились лишь незначительные возможности кислородного метаболизма углеводов. Ввиду потери ядра эритроциту требуется в 200 раз меньше кислорода, чем ядерному эритробласту. Также и потребность его в энергии гораздо меньше.

Бескислородный гликолиз в эритроците происходит обычным путем. В нормальном эритроците обнаружены все ферменты цикла Meyerhoff-Embden-Parnas. Кроме того, эритроциты способны использовать возникшие в процессе гликолиза трифосфатные метаболиты еще и другим путем, то есть в цикле Rapaport Luebering (цикл метаболизма фосфатных соединений). Метаболизм трифосфатных соединений в вышеуказанном цикле можно считать адаптационной реакцией эритроцитов. Он заключается в посредничестве в накоплении энергии, неиспользованной в процессе гликолиза богатых энергетически фосфатных соединений. Биологическое значение этого цикла заключается также во взаимодействии реакций, близких по действию аденозин-трифосфатазе (АТФ-азе), которой нет в эритроцитах человека. Отсутствие активной АТФ-азы в эритроцитах способствует преобладанию гликолиза. В нормальных условиях кислородный обмен не принимает участия в метаболизме глюкозы в эритроцитах. Кислородный обмен имеет место лишь тогда, когда имеется система транспорта электронов, которая обеспечивает непрерывность окисления НАДФ·Н₂. В эритроцитах система транспорта электронов отсутствует.

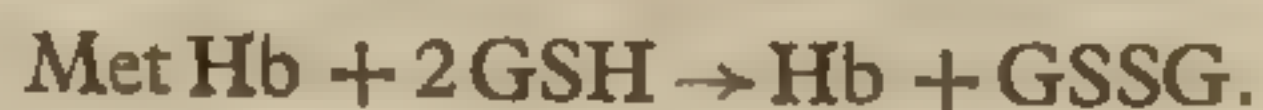
Редукцией гемоглобина управляют различные ферментные системы, главную роль из которых играют метгемоглобинредуктаза и глутатионредуктаза.

Метгемоглобинредуктаза. В нормальном эритроците концентрация метгемоглобина не превышает 1%. Такой низкий уровень его в эритроците зависит от регенерации редуцированных пиридиновых нуклеотидов. Существует два ферментных способа редукции метгемоглобина в эритроците, путем:

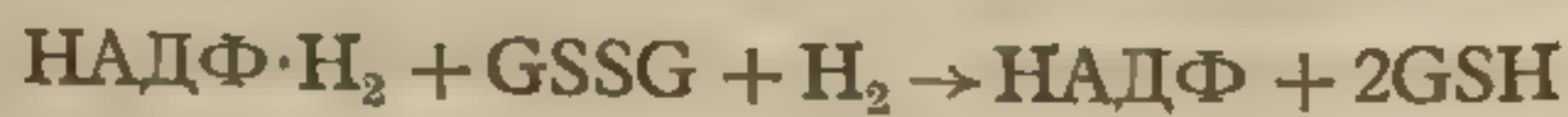
1) фермента, связанного с НАДФ·Н₂, который управляет обменом кислорода в инкубированных эритроцитах и имеет практическое значение при консервировании крови;

2) фермента, связанного с НАД·Н₂. Фермент этот является производным флавина (флавопротеид) и обладает редуцирующими способностями по отношению к метгемоглобину не только в клетках, но также и в гемолизатах эритроцитов.

В нормальном эритроците имеется еще и другая ферментная система, обеспечивающая редукцию метгемоглобина. Известно участие глутатиона:



Глутатионредуктаза катализирует редукцию окисленного глутатиона (GSSG) через редуцированный трифосфопиридиннуклеотид (НАДФ·Н₂) по формуле



Глутатион- и метгемоглобинредуктаза действуют сходным образом, одинаково эффективно как в присутствии НАДФ·Н₂, так и НАД·Н₂. Для эффективного действия этого фермента необходимо наличие кофактора, происходящего из оболочки. Редуцированный глутатион (GSH) имеется в боль-

шом количестве в нормальных эритроцитах. Глутатион редуцирует метгемоглобин. Его наличие в эритроцитах защищает гемоглобин и предохраняет его от окисления. Наличие редуцированной формы глутатиона имеет огромное значение и для других видов обмена. С глутатионом тесно связана лактол-глутатион-лиаза, которая имеется в эритроцитах.

В неповрежденных эритроцитах, как и в их гемолизатах, отмечается отчетливая фосфатазная активность, причем она различна с точки зрения рН, и зависит также от активности фосфатаз плазмы и лейкоцитов. Наибольшей активностью обладает кислая фосфатаза.

Глюкозофосфат-изомераза (ГФИ). Активность этого фермента в эритроцитах в среднем в 100 раз превышает активность его в плазме или в сыворотке. При некоторых видах гемолитической анемии активность ГФИ эритроцитов падает в противоположность повышению активности лактатдегидрогеназы. Рост отношения активности лактатдегидрогеназы к ГФИ может являться показателем интенсивности гемолитического процесса в крови. Увеличение активности ГФИ отмечается при хроническом миелоидном лейкозе.

Лактатдегидрогеназа. Рост активности этого фермента в сыворотке отмечается при серповидноклеточной анемии (в среднем в 3—4 раза) и еще больший при мегалобластической анемии. Возможно, что повышенная активность фермента отражает патологический метаболизм незрелых клеток, характеризующийся высокой гликолитической активностью.

Повышенная активность ферментов имеет место также у большинства больных с острым и хроническим лейкозом; в периодах ремиссии активность возвращается к норме. Ферментная активность повышена также при *lymphoma malignum*.

Эритроциты человека содержат фосфорибомутазу Н.

Протеолитические ферменты. В эритроцитах обнаружено 3, а в последнее время даже 4 разных фермента, которые обладают способностью переваривания денатурированного белка гемоглобина. Они находятся в оболочке эритроцита, из которой их можно экстрагировать при помощи KCNS или бутанола. Оптимум их действия лежит при разном рН.

Нуклеотид-пирофосфатаза. Фермент обнаружен в оболочке эритроцитов. Обладает действием, направленным на внеклеточный НАД.

Каталаза. Фермент находится в геме и вероятно выполняет защитную роль, предотвращая окисление гемоглобина. От каталазы зависит способность гемоглобина разлагать перекись водорода.

Карбоангидраза. Благодаря этому ферменту эритроциты обладают способностью быстрого преобразования двуокиси углерода и воды в угольную кислоту. Возможно, что она играет еще и другую роль в эритроцитах, а именно, принимает участие в процессе переноса двуокиси углерода из тканей в легкие. Этот фермент специфически тормозится сульфамидами. Однако, ввиду высокой концентрации его в эритроцитах, даже максимальные терапевтические концентрации сульфамидов являются для фермента еще подпороговыми.

Ацетилхолинэстераза эритроцитов является специфической эстеразой ацетилхолина, в отличие от эстеразы плазмы, которая не обладает такой специфичностью. Это в основном фермент оболочек эритроцитов, а роль его в транспорте калия все еще является предметом спора.

Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа отличается меньшей активностью в старых эритроцитах. Из этого факта — уменьшения ферментной активности Г-6-Ф-дегидрогеназы в периоде старения эритроцита — следует, что продолжительность жизни эритроцита обусловлена также степенью активности некоторых ферментных систем (54, 41).

Трансаминазы в цельной крови обладают большей активностью, чем в сыворотке. Это свидетельствует о более высокой активности фермента в эритроцитах. Активность GOT в цельной крови при врожденной и приобретенной гемолитической анемии является в среднем в два раза более высокой, чем в норме, особенно при увеличении числа ретикулоцитов. Рост активности GOT имеет место также при злокачественной анемии, особенно в периоде ретикулоцитарной регенерации.

ФЕРМЕНТОПАТИИ ЭРИТРОЦИТОВ

Причиной некоторых метаболических расстройств эритроцитов являются специфические ферментные дефекты. Они прежде всего касаются врожденных гемолитических анемий.

Отсутствие фермента или недостаточная активность его при наследственных заболеваниях обусловлены генетически: заболевание является результатом образования поврежденной или измененной молекулы фермента. В общих словах можно сказать, что поврежденный или измененный ген является причиной образования измененной белковой структуры. Структурные изменения могут не оказывать влияния на основную функцию молекулы. Например, структурно измененный гемоглобин при серповидноклеточной анемии не нарушает нормальной функции гемоглобина, то есть способности его к обратимому присоединению кислорода. Гемолитический эффект в этих случаях зависит от измененных физических свойств молекулы, не связанных с ее функцией.

ГЕМОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТОПЕНИЧЕСКИЕ АНЕМИИ

Характерной чертой этой группы заболеваний является гемолиз, вызванный эндогенным дефектом эритроцитов при участии экзогенного фактора. При ферментопенической гемолитической анемии отмечается небольшой дефицит глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФД). Дефицит фермента касается только эритроцитов. Этот дефицит приводит к торможению редукции НАДФ⁺, увеличению содержания НАДФ⁺ и уменьшению содержания НАДФ·Н₂. Так как редукция глутатиона зависит от наличия НАДФ·Н₂, то в эритроцитах уменьшается содержание редуцированного глутатиона. Уменьшение содержания НАДФ·Н₂ приводит также к снижению содержания НАД·Н₂. Несмотря на снижение гликолитической активности эритроцитов, содержание АТФ, АДФ и АМФ является почти нормальным.

Ферментный дефект и расстройства обмена веществ сами собой не ведут к сокращению длительности жизни эритроцитов. Лишь после воздействия вредных экзогенных факторов дело доходит до расстройства обмена и гемолиза. Встречаются также морфологические изменения, как тельца Гейнца. К вредным факторам можно отнести следующие: примаксин, пентахин, производные анилина, ацетанилид, нитрофурантоин, хлорамфеникол, парааминосалициловая кислота, фенилгидразин, сульфонамиды, бобы (*vicia faba*). Сходным образом действуют некоторые патогенные вирусы. Примаксин, а вероятно и другие вредные факторы, влияют на метаболизм эритроцита, катализируя окисление редуцированных пиридиновых нуклеотидов НАД·Н₂ и НАДФ·Н₂. Ферментопенические эритроциты особенно страдают от примаксина, ввиду уменьшенного содержания НАДФ·Н₂ и НАД·Н₂ и недостаточного количества редуцированного глутатиона. В ферментопенических эритроцитах снижается количество АТФ ввиду торможения гликолиза.

Примаксин
терых умень
Гемализ. В
применение
криз, вызв
ляции эрит
нормальное
окисление
махином.

Фавизм
у детей в
с потребле
в пищу поб
слабость, ж
чень. Желту
лей симпто
формы забо

Президент
С. С. Динатов
С. С. Динатов

Рис. 64. Влия

При фер
нием примак
ных выше
ся более бу
темная окр
которой со
наступает р
а в эритро
некоторые а
деструкции
зованием м
болевания у
нормальной
менение ле
криза опис
вает (39).

Лекарств
время. Он
заменено м

Примахин вызывает гемолиз, особенно более старых эритроцитов, в которых уменьшено содержание редуцированного глутатиона, АТФ и НАД. Гемолиз, вызванный примахином, прекращается, несмотря на дальнейшее применение препарата, что объясняется следующим образом: гемолитический криз, вызванный примахином, приводит к выбрасыванию молодой популяции эритроцитов. В этих эритроцитах отсутствует Г-6-ФД, но они содержат нормальное количество редуцированного глутатиона, который предотвращает окисление некоторых пиридиновых нуклеотидов, катализируемых примахином.

Фавизм (багдадская болезнь), который встречается главным образом у детей в Сицилии и южной Италии, является заболеванием, связанным с потреблением в пищу бобов (*vicia fava*). Через несколько часов после приема в пищу бобов повышается температура, появляется тошнота, рвота, общая слабость, желтуха, гемоглобинурия. Увеличивается селезенка, иногда и печень. Желтуха вызвана массовым распадом эритроцитов. Через несколько дней симптомы исчезают, остается только анемия. Имеются также abortивные формы заболевания.

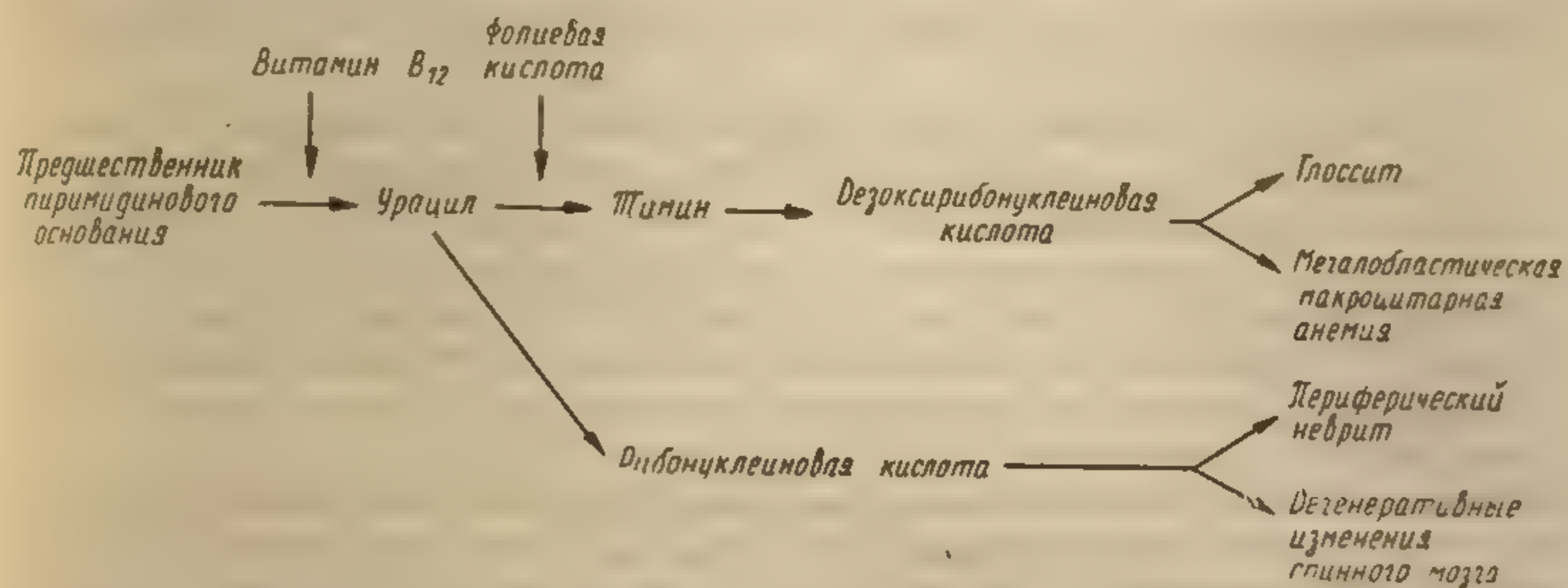


Рис. 64. Влияние витамина B₁₂ и фолиевой кислоты на синтез рибонуклеиновой и оксирибонуклеиновой кислот.

При ферментопенической гемолитической анемии, вызванной применением примахина, производных анилина, сульфонамидов, и других, перечисленных выше лекарственных веществ, клиническая картина заболевания является более бурной. После 2—3-дневного продромального периода появляется темная окраска мочи, в более тяжелых случаях может появиться желтуха, которой сопутствуют боли в брюшной полости и поясничной области. Затем наступает резкое падение уровня гемоглобина, эритроцитов и гематокрита, а в эритроцитах появляются тельца Гейнца. Здесь следует подчеркнуть, что некоторые авторы считают появление телец Гейнца доказательством частичной деструкции гемоглобина. Возникновение телец Гейнца связано также с образованием метгемоглобина. Количество ретикулоцитов в остром периоде заболевания увеличивается, осмотическая резистентность эритроцитов остается нормальной, реакция Кумса — отрицательной. Несмотря на дальнейшее применение лекарственного препарата через неделю после гемолитического криза описанные симптомы исчезают, а больной постепенно выздоравливает (39).

Лекарственные гемолитические состояния продолжаются ограниченное время. Они исчезают, когда большинство стареющих эритроцитов будет заменено молодыми. Дефицит Г-6-ФД не является качеством, свойственным

только эритроцитам, чувствительным к лекарственным веществам. Он характеризует также все стареющие с гематологической точки зрения нормальные эритроциты.

Ферментные расстройства, вызывающие изменения в эритроцитах, могут быть приобретенными. К ним относится мегалобластическая макроцитарная анемия, которая появляется при дефиците витамина B_{12} , или фолиевой кислоты, вызванном расстройством всасывания.

Фолиевая кислота является катализатором химических реакций, ведущих к синтезу нуклеиновых кислот, главным образом дезоксирибонуклеиновой кислоты клеточных ядер. Дефицит ее приводит к мегалобластическому эритропоэзу и макроцитарной анемии.

Отношение фолиевой кислоты к витамину B_{12} окончательно не выяснено. Оба вещества действуют как катализаторы химических реакций, ведущих к синтезу нуклеопротеинов. Отсутствие витамина B_{12} расстраивает синтез рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислот, а отсутствие фолиевой кислоты — синтез последней.

ФЕРМЕНТНЫЕ РАССТРОЙСТВА СИСТЕМЫ БЕЛОЙ КРОВИ

Первые труды Варбурга и его школы в прошлом веке показали, что лейкоциты в цитратной плазме отличаются очень слабым кислородным гликолизом. Более поздние исследователи (6, 23) обнаружили, однако, в лейкоцитах из экспериментального экссудата у животных, увеличение кислородного гликолиза. Сходные результаты получил Fujita (25) в лейкоцитах из крови здоровой крысы. Beck и Walentin, работая над клеточными гомогенатами, высказывают мнение, что нормальные лейкоциты обладают повышенным кислородным гликолизом.

Таким образом более новые данные противоречат положениям Варбурга, который считал, что отчетливый кислородный гликолиз является признаком, характерным для опухолевой клетки, хотя его можно наблюдать в быстро размножающихся клетках и в клетках, поврежденных в связи с активизацией некоторых ферментных систем. Этот вопрос еще окончательно не разрешен.

В циркулирующей крови лейкоциты обладают различным набором ферментов, в зависимости от вида лейкоцитов. Это связано с функцией, которую они выполняют, а также с различным их происхождением.

Нейтрофильные гранулоциты. Их функция заключается в фагоцитозе, транспорте ферментов и бактерицидном действии.

Явление фагоцитоза связано с освобождением гистамина из клеток в местах повреждения и воспаления. Фагоцитарная способность зависит от количества протеолитических ферментов, оксидаз, и вероятно липаз, в нейтрофильных гранулоцитах. Нейтрофильный гранулоцит обладает гораздо большими протеолитическими свойствами, чем лимфоцит. Ионы Mg^{++} и Ca^{++} стимулируют фагоцитоз.

Нейтрофильный гранулоцит выполняет функцию транспорта ферментов, которые освобождаются в тканях в месте повреждения. Он способствует проявлению воспалительной реакции и стимулирует функцию других клеток, имеющих в воспалительном очаге. Лейкоциты также способствуют удалению некротической ткани.

Бактерицидная функция нейтрофильных лейкоцитов зависит от мурамидазы, которая расщепляет сахара на поверхности бактерий. Активность мурамидазы увеличивается в кислой среде, оптимум действия ее лежит при pH — 4,0.

С точки зрения ферментологии, зрелый лейкоцит является особенно чувствительным к влиянию среды. Он изменяет свои ферментативные реакции под влиянием некоторых гормонов, особенно эстрогенов, кортизона и, вероятно, тироксина, а также под влиянием воспалительных реакций (65).

Нейтрофильный лейкоцит обладает гораздо более высокой гликолитической способностью, чем лимфоцит. Активность ГНІ в гранулоцитах в три раза больше, чем в лимфоцитах. Повышение активности щелочной фосфатазы в палочкоядерных и сегментированных гранулоцитах наблюдалось при стрессе, или же при возбуждении системы гипофиз-надпочечники. Молодые формы лейкоцитов не имеют фосфатаз. При патологических состояниях отмечается снижение щелочной фосфатазы при хроническом миелоидном лейкозе, и снижение кислой фосфатазы при хроническом лимфоидном лейкозе.

Глутаматдегидрогеназа обладает повышенной активностью в лейкоидных клетках, при острых и хронических миелоидных лейкозах, а также при лимфоидных лейкозах.

Ферментная активность аспартат-аминотрансферазы одинакова в нормальных лейкоцитах и лейкоидных клетках.

Лактатдегидрогеназа. Повышение активности этого фермента в сыворотке является результатом распада клеток и не имеет специфического значения. Однако согласно данным многих авторов активность этого фермента в клетках лейкоцитов и лимфоцитах при лейкозах является более низкой, чем в нормальных клетках. Особенно высокие количества имеют место при остром течении заболевания и в терминальной его фазе.

Альдолаза обнаруживает повышенную активность в клетках лейкоцитов при лейкозах.

Мурамидаза (старое название — лизоцим). Фермент широко распространен в организме, находится в крови, слюне, слезах, в большинстве паренхиматозных органов, в отделяемой слизистой оболочке желудка. Особенно высокая активность этого фермента обнаружена в слизистой оболочке желудка, при воспалительных состояниях желудочно-кишечного тракта, например, при язвенном колите — *colitis ulcerosa*, где количество его в 100 раз превышает нормальный уровень. Источником этих высоких количеств фермента являются нейтрофильные гранулоциты. Кроме вышеперечисленных, в лейкоцитах обнаружено много других ферментов, как липаза, амилаза, каталаза, пероксидаза, холинэстераза, пептидаза, протеолитические ферменты, фосфорилазы и другие.

Предполагается, что на почве ферментных расстройств возникает наследственное расстройство строения гранулоцитов, которое мы встречаем при аномалии ядер Pelger-Huet, при конституциональной гиперсегментации ядер нейтрофильных гранулоцитов и при аномалии зернистости Aldera (наследственные расстройства метаболизма полисахаридов).

Эозинофильные гранулоциты, согласно Vaughan, транспортируют гистамин и разные токсические субстанции к местам ферментной инактивации, богатым гистаминазой, которые находятся главным образом в легких и тонком кишечнике. Эозинофильные гранулоциты содержат около 30% общего гистамина крови (66). В зернистости эозинофильных гранулоцитов, которая имеет белковый характер, обнаружены следующие ферменты: оксидаза, пероксидаза, каталаза (эта последняя в большем количестве, чем в нейтрофильных гранулоцитах). Кроме того обнаружены протеиназы, дегидрогеназы (прежде всего сукцинатдегидрогеназа), щелочная фосфатаза и вероятно кислая фосфатаза. В последнее время обнаружена также амилаза, липаза и трипсин.

Лимфоциты являются местом выработки антител. Vannotti и Horvat показали, что содержание рибонуклеиновых кислот в лимфоците является очень высоким. Лимфоциты принимают участие в синтезе белков.

В лимфоцитах имеет место как кислородный так и бескислородный гликолиз, но менее интенсивный, чем в гранулоцитах. В изолированных лимфоцитах обнаружено большое количество ферментов: нуклеаза, аденозинкиназа, катепсин, амилаза, мурамидаза, липаза, а вероятно и протеазы. В лимфоцитах не обнаружено щелочной фосфатазы.

Моноциты. Строение их ядра не отличается от других лейкоцитов. В строении протоплазмы отмечены такие особенности, как наличие цитохром-оксидазы в овальных зернах диаметром $0,5-2 \mu$, наличие дегидрогеназ, отсутствие щелочной фосфатазы и наличие активности эстеразной фосфатазы.

Тучные клетки. В тучных клетках отмечается высокий уровень гистамина, который находится в зернистости клеток. Уменьшение количества тучных клеток наблюдается после освобождения гистамина в реакциях типа антиген-антитело, после введения АКТГ, гормонов коры надпочечников, и после стресса. Количество тучных клеток увеличивается при голодании, в состоянии гибернации, и при некоторых кожных заболеваниях. Тучные клетки появляются в костном мозге при апластической анемии, гемолитических анемиях, лейкозах и при других состояниях.

Кроме гистамина, тучные клетки содержат гепарин и принимают участие в ферментативных процессах свертывания крови. Таким образом ферментная активность лейкоцитов в физиологическом состоянии различна, в зависимости от вида клеток. Что касается гликолитической системы, то цикл Meyerhof вероятно сильнее развит в гранулоцитах. Альдолаза, которая является составной частью нервного метаболического пути, является также более активной в нейтрофильных гранулоцитах. Зато лимфоциты и моноциты отличаются более высокой активностью глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы.

Ферменты трикарбоксильного цикла: изоцитрат-дегидрогеназа и малат-дегидрогеназа обладают более высокой активностью в лимфоцитах и моноцитах. Дыхательная функция нейтрофильного гранулоцита является более интенсивной, чем лимфоцита. Протеолитические свойства, активность липазы и β -глюкуронидазы являются также более высокими в гранулоците, чем в лимфоците. Моноциты, молодые клетки ретикуло-эндотелиальной системы, обладают усиленными гликолитическими и протеолитическими свойствами. Эозинофильные гранулоциты отличаются от нейтрофильных меньшим потреблением кислорода и меньшей протеолитической функцией по Vannotti (65).

Ферментная активность лимфоцитов при патологических состояниях редко исчезает полностью; они продолжают выполнять такие жизненные функции клетки, как потребление кислорода, кислородный и бескислородный гликолиз, отмечается активность содержащихся в них ферментов. Это свидетельствует о том, что снабжение клетки ферментами значительно превышает ее энергетические потребности.

При экспериментальных воспалительных состояниях обнаружено уменьшение гликолитической и протеолитической функции нейтрофильного гранулоцита, особенно в месте проникновения его в воспалительно измененные ткани. Ферментная же активность лимфоцита в этих случаях вероятно повышена.

При лимфогрануломатозе активность щелочной фосфатазы резко повышена и составляет в лихорадочном периоде примерно 380% нормальной активности. В периоде ремиссии активность фермента возвращается к норме.

При хроническом лимфоидном лейкозе в лимфоците не обнаружено кислородного гликолиза (7, 48). Vannotti установил почти полное отсутствие гликолиза в лимфобласте при остром лимфоидном лейкозе; при хронической форме лимфоидного лейкоза этих изменений не было.

При миелоидных лейкозах получены различные результаты. Иногда изменения были такими же, как при новообразованиях, иногда же не было никаких изменений (7). При остром миелобластическом лейкозе Vannotti обнаружил в миелобластах интенсивный гликолиз и повышенную активность эстеразы. Но протеолитическая активность и дыхательная функция были более слабыми, чем в нормальных нейтрофильных гранулоцитах.

Колебания активности некоторых ферментных систем были исследованы также гистохимически. Valentin и Beck (63) обнаружили снижение активности щелочной фосфатазы лейкоцитов при миелоидном и хроническом лимфоидном лейкозе, при этих заболеваниях снижена активность лактатдегидрогеназы. При лейкозах снижена активность глюкокуронидазы, а также протеолитическая функция гранулоцитов. В воспалительных экссудатах повышается активность мурамидазы в зависимости от наличия нейтрофильных гранулоцитов.

В общих словах можно сказать, что активность некоторых ферментных систем в лейкоцитах при лейкозах снижается, за исключением альдолазы. Ферментные системы клеток костного мозга ведут себя иначе, чем зрелые лейкоциты. Неизвестно, зависит ли это от различия в метаболизме молодой и зрелой клетки, или же является выражением злокачественности лейкемических клеток.

ФЕРМЕНТНЫЕ РАССТРОЙСТВА ТРОМБОЦИТОВ

Тромбоциты, отщепившиеся от материнских клеток, то есть мегакариоцитов костного мозга, являются образованиями неправильной формы величиной 1—4 μ . В тромбоцитах различают зернистую структуру — грануломер и незернистую — гиаломер. Они состоят главным образом из органических субстанций. Белок составляет 57% веса тромбоцита. Из тромбоцитов выделено небольшое количество альбуминов, фибриногена, липопротеина, β_2 макроглобулина, γ , α_2 , β_1 глобулина. Кроме того обнаружен протеин S, который по растворимости и осаждаемости сходен с актомиозином; от него главным образом зависят явления ретракции сгустка. Этот белок сокращается *in vitro* под влиянием АТФ (9); существует сходство между сокращением мышцы и ретракцией сгустка. Липиды составляют около 19% сухого веса тромбоцитов; из этого большая часть приходится на кефалин и фосфатиды: фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, лецитин, фосфатидилинозитол, сфингомиелин. В очень небольшом количестве имеются нейтральные жиры и холестерин. В тромбоцитах обнаружены пуриновые основания (аденин, гипоксантин и другие), кроме того различные сахара (рибоза, глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза, глюкозамин, галактозамин), 2 мукополисахарида. Обнаружен цитохром, а также большие количества АТФ.

Тромбоциты играют большую роль в процессе свертывания крови и в транспорте многих тел. Они переносят: аскорбиновую кислоту, адреналин, норадреналин, гистамин и серотонин.

Ферменты в тромбоцитах размещаются следующим образом: 1) в грануломере находятся фосфолипиды, которые обладают тромбопластической активностью. Различают 3 вида зернистости. Однако преобладает зернистость α вида, в которой локализируются ферментные факторы I—II—III тромбоцитов; кроме того зернистость α вида обладает наибольшей протромбопласти-

ческой активностью. Зерна β вида — это мелкие митохондрии, содержащие АТФ; зерна γ вида — как бы микровакуоли; 2) гиаломер играет роль исключительно в формировании структуры сгустка благодаря наличию актомиозина, то есть влияет на ретракцию сгустка. В гиаломере обнаружен также фермент антигепаринового действия. Кроме того тромбоциты содержат ферменты, локализация которых не установлена. Среди ионов металлов, содержащихся в тромбоцитах, следует назвать: Na, K, Ca, Hg, Cu, Mn, Fe.

Тромбоциты хотя и не являются клетками в полном значении этого слова, но обладают активным метаболизмом. Одним из важнейших типов метаболизма тромбоцитов является их кислородная гликолитическая активность (кислородный гликолиз). В тромбоцитах отмечается высокое содержание гликолитических ферментов, но низкая ферментная активность цикла трикарбоновой кислоты.

Главным источником энергии является АТФ. От высокого энергетического потенциала тромбоцитов зависит нормальная ретракция сгустка и изменение вязкости в гиаломере тромбоцитов. В тромбоцитах содержится большое количество АТФ-азы и кислой фосфатазы. Последняя освобождается из тромбоцитов во время свертывания крови. Щелочной фосфатазы имеются лишь следы. Также трансаминазы и глутаматдегидрогеназы в тромбоцитах немного (39). Имеются пептиды, которые освобождаются из тромбоцитов во время свертывания крови. Обнаружено наличие глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, активность которой равна 150—350 единиц на биллион тромбоцитов. Уровень этого фермента в тромбоцитах снижается при вторичных тромбоцитопатиях при *erythematodes disseminatus*, при остром лейкозе и обострениях миелоидного лейкоза.

Результатом расстройств ферментной функции тромбоцитов являются тромбоцитарные ферментопатии. Сюда относится тромбастения (*thrombastenia*) типа Glanzman. Причиной этого заболевания является наследственный ферментный дефект двух гликолитических ферментов: глицеральдегидфосфат-дегидрогеназы и пируваткиназы. Кроме того отмечается уменьшение АТФ. Вышеназванные факторы принимают основное участие в ретракции сгустка. В стареющем тромбоците количество их уменьшается. В этой редкой наследственной форме геморрагического диатеза длительность кровотечения слегка увеличена, несмотря на нормальное количество тромбоцитов, ретракция сгустка нарушена, что зависит от ферментных расстройств, приведенных выше. Отмечается изменение формы тромбоцитов, их вакуолизация и так далее. При этом заболевании отмечаются внутриклеточные расстройства вязкости. Клиническая картина при нормальном количестве тромбоцитов сходна с болезнью Верльгофа.

В последнее время обнаружены ферментные расстройства в тромбоцитах у больных с циррозом печени. Установлено, что тромбоциты при циррозе печени бедны фосфатазой, АТФ и нуклеотидазой. При механической желтухе число тромбоцитов, как и их механическая функция, остаются нормальными (47). Наконец следует подчеркнуть, что противотромботические средства уменьшают потребление кислорода тромбоцитами.

СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ

Свертывание крови происходит в 4 фазы. В 1 фазе вырабатывается активный тромбопластин. Во 2 — под влиянием тромбопластина протромбин переходит в тромбин. В 3 фазе тромбин вызывает переход фибриногена в фибрин. 4, фибринолитическая фаза, заключается в колликации образовавшегося сгустка.

Тромбопластин может образовываться эндогенно — это плазменный тромбопластин, возникающий при взаимодействии плазменных и тромбоцитарных факторов, или экзогенно — тканевой тромбопластин из поврежденных тканей. С 1955 года различают две системы генераций тромбина.

1. В экзогенной системе свертывания, процесс свертывания начинается благодаря проникновению тканевого тромбопластина в кровь. Действие тканевого тромбопластина на протромбин возможно благодаря плазменным факторам, фактору VII, фактору V, фактору X и ионам кальция.

2. В эндогенной системе свертывания кровь свертывается без участия тканевого тромбопластина. Плазменный тромбопластин образуется при участии тромбоцитов и следующих плазменных факторов: фактора Hageman, антигемофильных факторов (VIII, IX, PTA), фактора X, ионов кальция и фактора V.

Некоторые факторы системы свертывания крови:

фактор II — протромбин, является α_2 глобулином, вырабатываемым в печени;

фактор III — тромбопластин (тромбокиназа);

фактор V — проакцелерин — неустойчивый фактор;

фактор VI — акцелерин — более активная форма;

фактор VII — проконвертин;

фактор VIII — фактор AHG-A — *antihæmophilic* глобулин A;

фактор IX — AHG-B — *antihæmophilic* глобулин B, или фактор Christmas по фамилии биолога.

PTA — *plasma thromboplastin antecedent*, или *Antihæmophilic C Factor*;

Фактор Hageman (по фамилии больного), или фактор контакта.

Протромбиновый комплекс — это протромбин вместе с акцелераторами, которые ускоряют его конверсию в тромбин под влиянием действия тканевого тромбопластина и ионов кальция. В состав плазменного комплекса протромбина входят следующие: фактор V, фактор VII, фактор X. Протромбиновый комплекс определяют, измеряя протромбиновое время одностапным способом Quick.

Ферменты тромбоцитов, принимающие участие в свертывании крови по Deutsch (20):

тромбоцитарный фактор 1) по своему строению и действию очень сходен с фактором V. Он вероятно является фактором V, адсорбированным на тромбоцитах;

тромбоцитарный фактор 2) ускоряет реакцию тромбина с фибриногеном;

тромбоцитарный фактор 3) принимает участие в образовании активного тромбопластина (кефалин);

тромбоцитарный фактор 4), или противогепариновый. Нейтрализует гепарин;

тромбоцитарный фактор 5) стабилизирует фибрин;

тромбоцитарный фактор 6) тромбоцитарный антифибринолизин;

тромбоцитарный фактор 7) тромбоцитарный антитромбопластин;

тромбоцитарный фактор 8) тромбоцитарный ко-тромбопластин, фактор

типа змеиного тромбопластина (венина).

Кроме того имеется серотонин и фактор ретракции сгустка.

Ретракция сгустка. Тромбоциты играют основную роль в формировании структуры сгустка крови или плазмы. Эту функцию они выполняют при участии двух механизмов: 1) путем влияния на полимеризацию фибриногена. Тромбоциты выбрасывают псевдоподии длиной до 15 μ . Контакт фибриногена с псевдоподиями облегчает его деполимеризацию вдоль псевдоподий;

2) благодаря притяжению нитей фибрина при помощи сокращающегося гиаломера тромбоцитов (актомиозин).

В последнее время обсуждается еще третий механизм, управляемый тромбоцитами. Как известно группы $-SH$ и $-SS$ играют роль на разных этапах образования структуры сгустка. Оказалось, что в тромбоцитах имеется ферментная система, способная к изменениям группировок $-SH$. Речь идет о синтезе тромбоцитами таурина из цистеина. Обнаружено также, что ингибиторы $-SH$ тормозят ретракцию. Эффект торможения можно ликвидировать при помощи цистеина (61). Формирование и стабилизация структуры сгустка

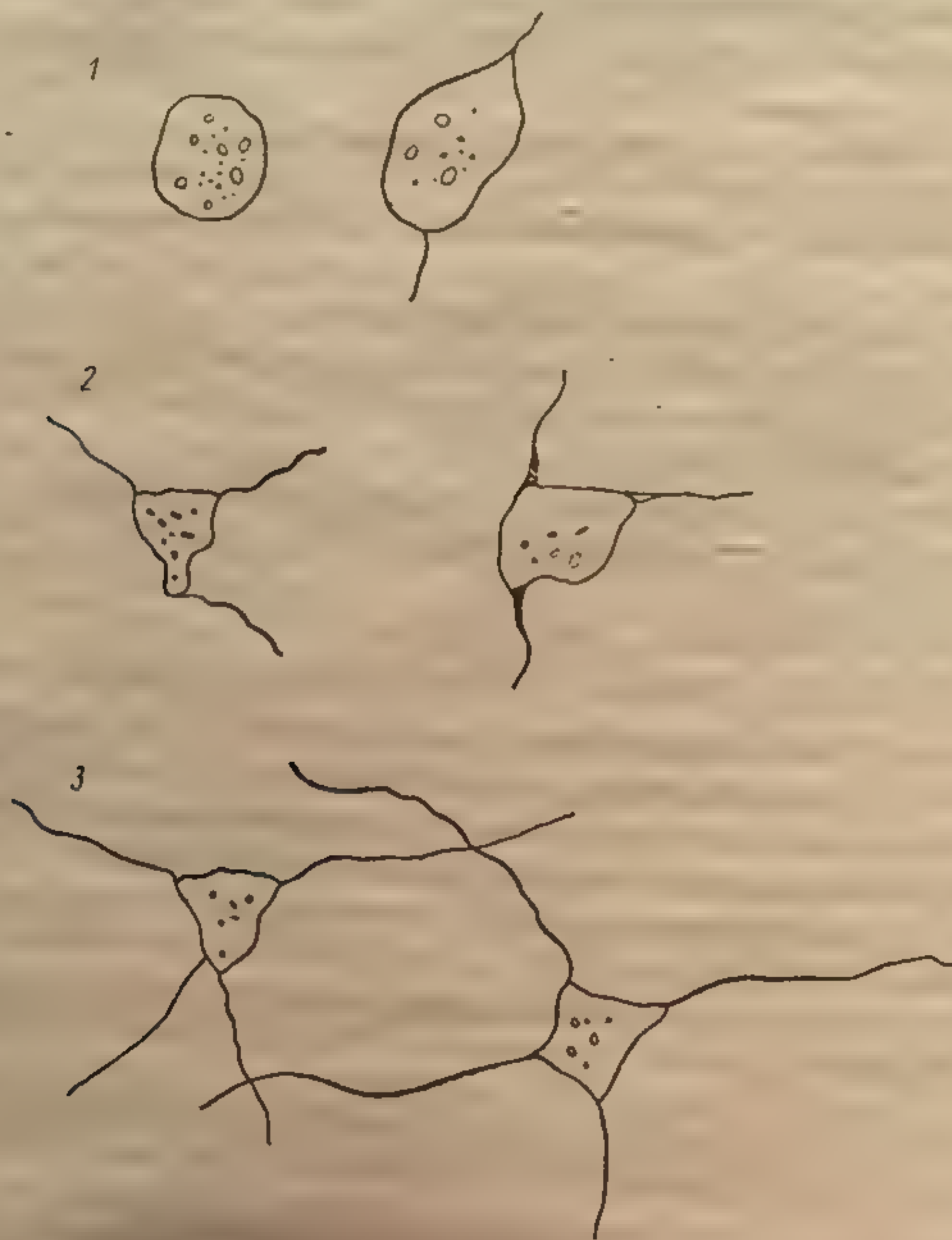


Рис. 65. Морфологические изменения в тромбоцитах при образовании кровяного сгустка.

кроме того стимулируется альбумином, цистеином и глутатионом тромбоцитарного происхождения. АТФ не принимает участие в явлении ретракции.

Тромбоциты, циркулирующие в крови, - находятся в невозбужденной (нормальная форма большинства тромбоцитов) и возбужденной форме (в небольшом проценте).

Форматромбоцита с сохранившейся еще клеточной структурой, но с происходящим внутри клетки изменением вязкости и пространственной трансформацией гиаломера (выбрасывание псевдоподий) является активной. Период внутриклеточного изменения вязкости является периодом аккумуляции ферментной энергии в тромбоците.

В периоде, предшествующем участию тромбоцитов в кинетике свертывания

крови, под влиянием контакта с поверхностью происходят изменения в тромбоцитах: изменение внутриклеточной вязкости и освобождение (выброс) зернистости в окружающую жидкость. С изменением вязкости в тромбоцитах связано склеивание их и агглютинация, которые наряду с другими изменениями (сосудистыми и другими) играют роль в остановке кровотечения. Тромбоциты, во время внутриклеточных изменений вязкости, освобождают в окружающую плазму гранулы, содержащие фосфолипиды, то есть фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, и таким образом принимают участие в тромбопластиногенезе. Увеличение тромбопластической активности фосфатидилсерина наступает в присутствии лецитина вероятно путем увеличения дисперсии фосфатидилсерина. В период изменений в тромбоцитах (изменение вязкости — *viscous metamorphosis of platelets*) в плазме происходят следующие реакции между факторами свертывания:

а) между фактором контакта (фактор Hageman) РТА, АНГ-А, или фактором VIII (антигемофильный глобулин А), фактором Christmas, или IX (антигемофильный глобулин В), причем возникает первый протромбопластический продукт;

б) превращение первого протромбопластического продукта при участии ионов кальция, фактора V, VII, и фосфолипида, освобожденного из тромбоцитов; возникновение второго протромбопластического продукта;

в) образование тромбопластина, активного в плазме крови.

Взгляды большинства авторов на роль АНГ-А в кинетике образования активного тромбопластина, расходятся. Тромбоциты не обладают свойствами активного тромбопластина, однако они доставляют факторы фосфолипидного строения, которые являются кофакторами, важными для образования активного тромбопластина.

Роль кальция в свертывании крови. Ионы кальция необходимы для двух типов реакции свертывания:

- 1) генерации (образования) активного тромбопластина;
- 2) активации конверсии протромбина тромбопластином.

Наличие ионов кальция не является обязательным для осаждения фибриногена тромбином, тем не менее реакция протекает быстрее в присутствии кальция. Кроме того, кальций необходим для так называемой „твердости“, то есть образования плотного сгустка. При отсутствии кальция сгусток бывает мягким.

При отсутствии кальция фактор V быстрее исчезает из плазмы. Кальций выполняет специфическую роль в процессе свертывания крови и не может быть замещен ионом другого металла.

Конверсия протромбина в тромбин является одним из главных этапов реакции свертывания крови. Тромбин возникает в результате расщепления протромбина в пептидных связях аргинило- или лизина. Предполагается, что на первом этапе свертывания крови образуется высоко специфическая проназ, которая обладает способностью расщеплять молекулы протромбина в местах указанных связей и образовывать тромбин. Благодаря этой протеолитической реакции образуется молекула тромбина, почти в два раза меньшая, чем молекула протромбина. Тромбин является белком, относящимся к гликопротеинам, обладающим как ферментной активностью в процессе свертывания крови, так и эстеразной активностью; гидролизует эфирные связи.

Сходный протеолитический механизм активации протромбина проявляют трипсин и папаин; однако они требуют несколько иных условий для активации протромбина. Яд некоторых змей, например яд кобры, очень активно свертывает фибриноген.

Ингибиторы свертывания. В физиологических условиях в крови имеются тела, препятствующие свертыванию крови — ингибиторы свертывания. Они находятся в плазме и тканях и действуют как антитромбопластин и антитромбин.

Ингибиторы тромбопластина. Принято считать, что существует тканевой ингибитор — тканевой антитромбопластин АТТ и плазменный ингибитор — плазменный антитромбопластин АТП I и АТП II (20). Плазменные антитромбопластины находятся в α глобулиновой фракции сыворотки. Физиологические свойства названных ингибиторов различны.

Антитромбины являются физиологическими ингибиторами свертывания, которые нейтрализуют тромбин, образующийся во время свертывания крови. Имеется несколько типов антитромбинов: антитромбин I, который идентифицируется с фибриногеном (фибриноген абсорбирует большую часть тромбина во время конверсии). Антитромбин II — кофактор гепарина — многими идентифицируется с антитромбином III. Затем идет антитромбин IV, V и антитромбин VI, который согласно Niewiarowski, Kowalski (44, 45) образуется во время расщепления фибриногена плазмой или другими протеолитическими ферментами.

Кроме плазменных ингибиторов существуют тканевые ингибиторы свертывания. К ним относятся: гепарин, липидные ингибиторы, а также некоторые белковые ингибиторы свертывания.

Образование сгустков фибрина под влиянием тромбина на фибриноген. Конверсия фибриногена в фибрин начинается с протеолитического действия тромбина, который вызывает отщепление от фибриногена фибринопептида с молекулярной массой 6000—8000. Фибриноген имеет две конечные тирозильные группы и I-N-глутамиловую. После расщепления 2-тирозольные и 3-N-глициловые конечные группы появляются в молекуле фибрина, тогда как отщепленный кислый пептид содержит I-N-глутамиловую конечную группу.

На втором этапе имеет место явление полимеризации мономеров фибрина, и на конечном, третьем этапе соединение этих полимеров по типу конец в конец и бок в бок. Образуется объемная сетка фибрина.

Процесс фибринолиза является следующей фазой процесса свертывания крови, в которой дело доходит до ферментативной колликвации образовавшегося сгустка. Фибрин является субстратом для активного фибринолитического фермента. Как ферментный процесс образования фибрина, так и колликвация его являются физиологическими процессами, цель которых — поддержание циркулирующей крови в жидком состоянии. Механизмы, управляющие образованием сгустка и колликвацией его (фибринолизом) тесно связаны между собой. В физиологических условиях протеолитический фермент, ответственный за колликвацию сгустка, то есть плазмин (фибринолизин) отсутствует в крови в активной форме и имеется только в виде профермента, так называемого плазминогена (профибринолизин). В процессе активации плазминогена принимают участие активаторы как тканевого, так и плазменного происхождения, а в патологических условиях также и бактериального. Вероятно существует два физиологических механизма активации плазминогена:

- 1) активация плазминогена плазмы активатором тканевого происхождения, то есть освобожденного из тканей в местах их повреждения. Этот процесс имеет очень важное локальное значение, так как предотвращает появление пристеночных тромбов или быстро растворяет их, не допуская до изменений в проницаемости сосудов и кровотоке;

2) активация плазминогена плазмой активатором, возникшим в крови (патологическая активация проактиватора, находящегося в физиологических условиях в плазме). Активация плазминогена, происходящая в этих условиях, имеет системный характер во всем организме, так как активированный плазмин не только растворяет имеющийся фибрин, но и вызывает геморрагический диатез с несвертываемостью крови. Он одновременно гидролизует фибриноген, протромбин, антигемофильный глобулин, проакцелерин и многие другие белки, не связанные с процессом свертывания крови.

Спонтанная фибринолитическая активность крови свойственна всем здоровым людям. Мобилизация механизма коагуляции сгустка в плазме окончательно не выяснена. Согласно существующим гипотезам:

1) в определенных условиях плазма содержит активный активатор плазминогена, который индуцирует конверсию плазминогена в плазмин, или

2) плазминоген активируется тогда, когда подвергнется разрушению ингибитор плазмينا — антиплазмин. В физиологических условиях стресс, физическое усилие, и другие факторы вызывают значительное ускорение фибринолиза в свернувшейся плазме. Вообще, усилению фибринолитической активности (главным образом в локальных условиях) не сопутствуют геморрагические симптомы.

Активаторы плазминогена могут быть различными: бактериального происхождения, как стрептокиназа, вырабатываемая штаммом *streptococcus beta-haemolyticus*, стафилокиназа и уреазы; активаторы в циркулирующей крови, тканях и так далее.

Физиологические ингибиторы фибринолиза. В физиологических условиях в крови имеется фермент — антиплазмин (антифибринолизин), роль которого заключается в инактивации фермента плазмينا в условиях устойчивого ферментного равновесия. Ингибиторное (антиплазминозное) свойство плазмы вероятно вызвано наличием двух разных веществ. Ингибиторы плазмينا вероятно действуют в двухэтапной реакции; сначала быстрой и независимой от температуры и обратимой, а затем медленной, зависящей от температуры, во время которой образуется ингибированный плазмин, неспособный к регенерации.

Гипофизарно-надпочечниковая система оказывает влияние на фибринолитическую систему. Реакции между плазмином и антиплазмином направляются системой гипофиза — кора надпочечников. Итак, АКТГ или кортизон вызывают рост антиплазминовой активности крови, тогда как введение адреналина или питуитрина снижает уровень антиплазмينا в крови. Кроме гипофизарно-надпочечниковой системы, и другие гормональные системы принимают участие в управлении процессами фибринолиза. В последнее время говорят об участии половых гормонов, а также о влиянии селезенки на фибринолитическую активность.

В фибринолитической системе человека принимают участие:

- 1) киназы — происхождения тканевого или плазменного (иногда стрептокиназа), которые вступают в реакцию с проактиватором, находящимся в физиологических условиях в плазме;
- 2) проактиватор плазминогена;
- 3) активатор плазминогена, который образуется при воздействии киназы на проактиватор. Активный активатор действует в аутокаталитической реакции с плазминогеном;
- 4) плазминоген (профибринолизин), который является β глобулином;
- 5) плазмин (фибринолизин) протеолитический фермент, который разлагает фибриноген, фибрин и другие белки.

Ингибиторы фибринолиза составляют регулирующий механизм, противостоящий чрезмерному фибринолизу. Это: а) ингибитор стрептокиназы (антистрептокиназа); б) ингибитор активатора плазминогена; в) ингибитор плазмина — антиплазмин. В настоящее время известны по крайней мере два антиплазмينا.

МЕСТО ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ КРОВОТЕЧЕНИЙ

Существуют геморрагические диатезы, причиной которых может являться усиленная активность фибринолитической системы. Усиление фибринолитической активности крови приводит к увеличению проницаемости эндотелия капилляров, и вследствие этого к проникновению плазмы или крови в межкапиллярные пространства и разные органы. Если имеется общее увеличение растворимости фибрина, может развиваться геморрагический диатез с массивными кровотечениями.

Клинические состояния геморрагического диатеза часто сочетаются с ростом фибринолитической активности в крови, причем механизм свертывания крови может быть нормальным. Фибринолитические состояния часто связаны с гипофибриногенцией вследствие уменьшения количества фибриногена под воздействием плазмина или в результате внутрисосудистого образования сгустков.

Сопоставление некоторых типов геморрагического диатеза, вызванных расстройствами факторов свертывания крови.

Гемофилия — Гемофилия А — или так называемая классическая гемофилия, вызванная отсутствием или наследственным дефицитом фактора VIII ANG-A, является генетическим расстройством гена X. Наследуется по рецессивному типу в связи с полом. Клиническая картина бывает тяжелой, если ANG-A отсутствует полностью или не превышает 5%, средней при ANG-A от 5 до 10%, легкая картина при ANG-A выше 10% нормы.

При гемофилии В отмечается отсутствие или значительный дефицит фактора IX или ANG-B или PTC. Клиническая картина и течение заболевания более легкое, чем при гемофилии А. Наследуется по рецессивному типу в связи с полом.

Гемофилия С — отсутствие или дефицит фактора XI или PTA. Заболевание очень редкое, встречается у обоих полов. Клиническая картина легкой гемофилии.

Дефицит фактора Hageman (фактор XII) может являться причиной сильных кровотечений, вызванных мелкими хирургическими операциями, как, например: экстракция зубов. Идиопатических кровотечений не встречается.

Дефицит фактора V (врожденный) — парагемофилия — выступает у обоих полов. Клиническая картина сходна с гемофилией. Заболевание редкое.

Дефицит протромбина, или фактор II — встречается очень редко. Клиническое течение легкое.

Врожденная афибриногенемия — заболевание очень редкое. Отсутствует фибриноген (фактор I). Отмечается отсутствие свертывания крови также после прибавления тромбина. Клиническая картина сходна с гемофилией, течение иногда легкое.

Дефицит фактора VII (врожденный) — гипопроконвертинемия — встречается у обоих полов. Заболевание может протекать в легкой и тяжелой форме; встречается редко.

1. Alexander I.
and proconvertin
O. K.: Fibrinol
1959. — 4. All
hematology; Ox
ker A.: Klin. W
8. Beck W. S.
Luncheon E. F.:
Alving S. A.: J
11. Beutler E.
Acta med. Acan
Blutzellen. G.
1959. — 15. Br
Smal W. J., D
The Amer. Jou
use of enzymes.
19. Deutsch E.,
lischen Erkrank
21. Dittrich
Stuttgart; 1960
W., Kubowitz:
25. Fujita A.:
27. Garfield D
Harper H. A.:
29. Gross R. T.
R. T.: Die eo
G. Thieme, St
31. Gruchy
32. Hitzig W. J.
33. Hialt R. B.
Delafresnaye J
fibrinolytic sys
36. Jonxis J. H.
Chem., 219, 60
H. D.: Deuts
R. A.: Brit. J
41. Marks I
42. Masure R.
Paris, 1960. —
wiarowski S.:
mathologie 13
drazzini A., S
1061, 1930. —
pathology. Bla
51. Ratnoff
52. Robinson M.
menant M., 2
1325, 1951. —
coagulation fr
Mühlhauser V
Biophys., Act
Physiologie u
60. Smart G.
61. Sokal C
pka T.: Chon
J. Clin. Med.
65. Vannotti
Schwabe Ver
Yourke A.: A
Munsey F. A
G. G. Diseas
B. S.: Blood
71. Wolste
Churchill 19

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexander B.: Some biochemical, physiochemical and immunochemical studies of prothrombin and proconvertin. Sym. X. IV Internat. Congress of Biochemistry, Vienna 1958. — 2. Albrechtsen O. K.: Fibrinolytic activity in the organism. Aarhus. — 3. Aldridge W. N.: The Lancet, 2, 546, 1959. — 4. Allicon A. C.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. British Society for hematology; Oxford IV, 1961. — 5. Altman K. J.: Amer. J. of Medicine 27, 936, 1959. — 6. Baker A.: Klin. Wschr. 6, 252, 1927. — 7. Barron E. S. G. et Harrop G.: J. Biol. Chem. 84, 89, 1929. — 8. Beck W. S. et Valentine W. N.: Cancer Res., 12, 818, 1952. — 9. Bettex E. R., Galland M. et Luncher E. F.: Helvetia physiol. pharmacol., Acta 14, 1763, 1959. — 10. Beutler E. R., Dern J., Alving S. A.: J. Lab. clin. Med., 84, 49, 1957.
11. Beutler E., Dern J., Flamagan C., Alving A. S.: J. Lab. Clin. Med. 45, 286, 1955. — 12. Blix S.: Acta med. Acad. 2, 170, 1961. — 13. Bransteiner H.: Physiologie u. Physiopathologie der weissen Blutzellen. G. Thieme; Stuttgart, 1959. — 14. Brugsch J.: Porphyrine Barth. Verlag Leipzig 1959. — 15. Brinkhous K. M., Roberts H. R.: J. A. M. A. 4, 175, 1961. — 16. Campbell E. W., Smal W. J., Demeshek W. J.: Lab. clin. Med. 4, 835, 1956. — 17. Clander D., Guest M. M.: The Amer. Journ. of Cardiology 6, 2, 409, 1960. — 18. Clifton E. E.: Historical review of clinical use of enzymes. Enzymes in Health and Disease b. Greenberg D. Harper, H. Springfield 1960. — 19. Deutsch E., Elsner P.: Amer. Journ. of Cardiology 6, 420, 1960. — 20. Deutsch E.: Die Thrombolischen Erkrankungen. Gerinnungsphysiologie F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart; 1960.
21. Dittrich W.: Physiologie u. Physiopathologie d. weissen Blutzellen. G. Thieme Verlag, Stuttgart; 1960. — 22. Elsner P., Kainer E.: Wien. Klin. Wschr. 69, 138, 1957. — 23. Fleischmann W., Kubowitz: Bioch. Z. 181, 395, 1927. — 24. Frick P. G.: Schw. Med. Wschr. 42, 1246, 1961. — 25. Fujita A.: Klin. Wschr. 7, 897, 1928. — 26. Gaertner H.: Krzepnięcie krwi, PZWL, 1960. — 27. Garfield Duncan G.: Diseases of Metabolism, Philadelphia 1960. — 28. Greenberg D. M., Harper H. A.: Enzymes in health and disease Ch. C. Thomes Springfield (U. S. A.) 1960. — 29. Gross R. T., Marks P.: Enzymes in blood. Annal. N. Y. Acad. Sc. 75, 106, 1958. — 30. Gross R. T.: Die eosinophilen Leukozyten. Physiologie u. Physiopathologie der weissen Blutzellen. G. Thieme, Stuttgart 1959.
31. Gruchy G. C. de: Clinical Haematology in medical Practice. Blackwell; Oxford 1958. — 32. Hitzig W. H., Frick P. G., Betke K., Huisman T. H. J.: Helw. paediatr. Acta 15, 499, 1960. — 33. Hialt R. B., Engle C., Flood C., Karush A.: J. Clin. Investig. 31, 721, 1952. — 34. Jonxis J. H., Delafresnaye J. F.: Abnormal Haemoglobins. Masson, Paris; 1959. — 35. Jensen H. F.: The fibrinolytic system of blood. D. Greenberg, H.: Enzymes in Health a. Disease. Springfield 1960. — 36. Jonxis J. H.: Schw. med. Wschr. 91, 1037, 1961. — 37. Kinney Mc. G. R., Goche D. J.: J. Biol. Chem., 219, 605, 1956. — 38. Larizza P. Z.: Klin. Med., 156, 287, 1960. — 39. Löhr G. W., Waller H. D.: Deutsche med. Wschr. 86, 27, u. 87, 1961. — 40. Mac Iver J. E., Went L. N., Irwine R. A.: Brit. J. Haematology 7, 373, 1961.
41. Marks P. A., Johnson A. B., Hirschberg E., Banks J.: Ann. N. Y. Acad. Sci 75, 95, 1958. — 42. Masure R.: Les inhibiteurs normaux et pathologiques de la coagulation sanguine. Masson, Paris, 1960. — 43. Maupin B.: Chimie des plaquettes sanguines. Hémostase 1, 29, 1961. — 44. Niewiarowski S.: Krzepnięcie krwi, PZWL, 1960. — 45. Niewiarowski S., Kowalski E.: Revue d'Hématologie 13, 320, 1958. — 46. Norman P. S.: Amer. J. of Cardiology 6, 390, 1960. — 47. Pedrazzini A., Salvidio E.: Acta Haematologica, Basel 18, 42, 1957. — 48. Peschel E.: Klin. Wschr. 9, 1061, 1930. — 49. Pranker T. A. J.: The red cell. An account of its chemical physiology and pathology. Blackwell, Oxford, 1961. — 50. Pritchard J. A.: A. J. Physiol. 158, 72, 1949.
51. Ratnoff O. D., Donaldson V. H.: The Amer. J. of Cardiology VI, 378, 1960. — 52. Robinson N. A., Brouwen Loder P. de Gruchy G. C.: Brit. J. Haematol., 7, 327, 1961. — 53. Ryman M., Tagnon H. J.: Enzymes in clinical medicine. The New Engl. J. of Medicine 261, 1325, 1951. — 54. Sabin J. C.: J. Clin. Invest. 19, 833, 1949. — 55. Sarkar N. K.: Enzymes in blood coagulation from: Enzymes in health a. disease. Springfield U.S.A. 359, 1960. — 56. Schimpf Kl., Mühlhauser W., Teupel R.: Hémostase 1, 63, 1961. — 57. Scott E. M., Griffith J. V.: Biochim. Biophys., Acta 34, 584, 1959. — 58. Scott E. M.: J. Clin. Investig. 39, 1176, 1960. — 59. Seelich F.: Physiologie u. Physiopathologie d. weissen Blutzellen. G. Thieme Verlag Stuttgart 151, 1959. — 60. Smart G. A.: Metabolic disturbances in Clinical Medicine Churchill, London 1958.
61. Sokal G.: Plaquettes sanguines et structure du caillot. Arscia, Bruxelles, 1960. — 62. Tempka T.: Choroby układu krwiotwórczego. PZWL 1955. — 63. Valentine W. N., Beck W. S.: J. Clin. Med. 38, 245, 1951. — 64. Vannotti A., Cullity B.: Schweiz. Med. Wschr. 90, 955, 1960. — 65. Vannotti A., Frei J., Borel C., Antonioli J.: In Regulations enzymatiques en clinique. Beno Schwabe Verlag. Basel Stuttgart 1960. — 66. Vaughan J.: Blood 8, L, 1953. — 67. Wagner R., Yourke A.: Archiv. Biophysic 44, 415, 1953. — 68. Waisman H. A., Bain J. A., Richmond J., Munsey F. A.: Pediatrics 10, 293, 1952. — 69. Watson C. J.: Porphyria Metabolism in Duncan G. G. Diseases of Metabolism, Philadelphia 1960. — 70. Wheby M. S., Thorup O. A., Lewell B. S.: Blood; 11, 266, 1956.
71. Wolstenholme G. E. W., O'Connor C. M.: Biochemistry of human Genetics. London, Churchill 1959. — 72. Wurzel H., Mc Creary T., Baker L., Gurnerman L.: Blood; 27, 314, 1961.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОЧЕК

FRANCISZEK KOKOT

ФЕРМЕНТОЛОГИЯ НЕФРОНА

Функцию нефрона можно свести к трем основным процессам:

- а) фильтрация в почечных клубочках;
- б) реабсорбция некоторых составных частей из ультрафильтрата в кровяное русло и
- в) выделение различных субстанций в просвет канальцев.

Если процесс образования клубочкового фильтрата является чисто физическим процессом (с чем не все ученые соглашались), то остальные функции нефрона обусловлены существованием нормально функционирующих ферментных систем. Хотя мы еще далеки от точного знания ферментной топографии нефрона и связи ее с функцией отдельных частей нефрона, однако, известные уже факты позволяют судить о большой ферментной дифференциации его отдельных составных частей. Ферментологические исследования изолированных почечных клубочков показали, что в них имеется относительно небольшое количество различных ферментов. Это позволяет судить о небольшой метаболической активности данного отрезка нефрона (14, 24, 46). В следующих отрезках отмечается большая биохимическая дифференциация. Так, в извитых канальцах первого порядка обнаружены ферменты цикла Кребса и окислительного фосфорилирования. Гораздо беднее разными ферментами как нисходящая, так и восходящая петли, а также прямой канал (14, 24). Заслуживает внимания более высокая активность γ -глутамил-транспептидазы в мозговом, чем в корковом слое почек (39). Один из ученых, занимавшихся изучением этого вопроса, утверждает, что различия в ферментном составе между клеткой прямого канальца и клеткой извитого канальца первого порядка так велики, как между почечной клеткой и клеткой соединительной ткани (46). Несмотря на большие количественные различия в концентрации ферментов в различных частях нефрона, до сих пор не обнаружено несомненных качественных различий (10, 11). Однако заслуживает внимания очень небольшое количество фумаразы в почечных клубочках (46).

Ферментная топография нефрона в патологических состояниях изучена фрагментарно, и то лишь при некоторых заболеваниях. К ним относятся канальцевый ацидоз и врожденная канальцевая нефропатия. Yaffe и сотрудники (15) обнаружили в биоптическом материале почек у больных с канальцевым ацидозом нормальную активность карбоангидразы, глутаминазы и сукцинатдегидрогеназы, и очень низкую активность НАДФ-диафороазы, связанной с изоцитрат-дегидрогеназой цикла Кребса. Авторы считают, что причиной отсутствия энергии, необходимой для образования градиента концентрации водородных ионов, является отсутствие или недостаточное количество выше названного фермента. Канальцевый ацидоз является, таким образом, результатом отсутствия карбоангидразы, расстройства образования аммиака, или расстройства реабсорбции бикарбонатов, что было доказано также и другими авторами (16, 50).

Pollak и сотрудники (43), определяя активность щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы при различных канальцевых нефропатиях, обнаружили падение активности первого фермента в извитых канальцах I порядка при глюкозурии, канальцевой фосфатурии и синдроме Фанкони. Эти же авторы, у 3 больных с врожденной гипофосфатаземией без глюкозурии, обнаружили очень низкую активность щелочной фосфатазы в извитых канальцах первого

порядка. Эти факты заставляют усомниться в правильности наших взглядов на реабсорбцию глюкозы, существовавших до сих пор (смотри 46). В свете этих данных процессы фосфорилирования и фосфоролита вероятно не обуславливают реабсорбции глюкозы из клубочкового фильтрата.

Все еще не выяснены ферментные механизмы, обуславливающие реабсорбцию аминокислот. Считается, что в основном существует три ферментных механизма, регулирующих реабсорбцию аминокислот (33, 46). Первый из них обуславливает реабсорбцию двуосновных аминокислот, второй — моноамино

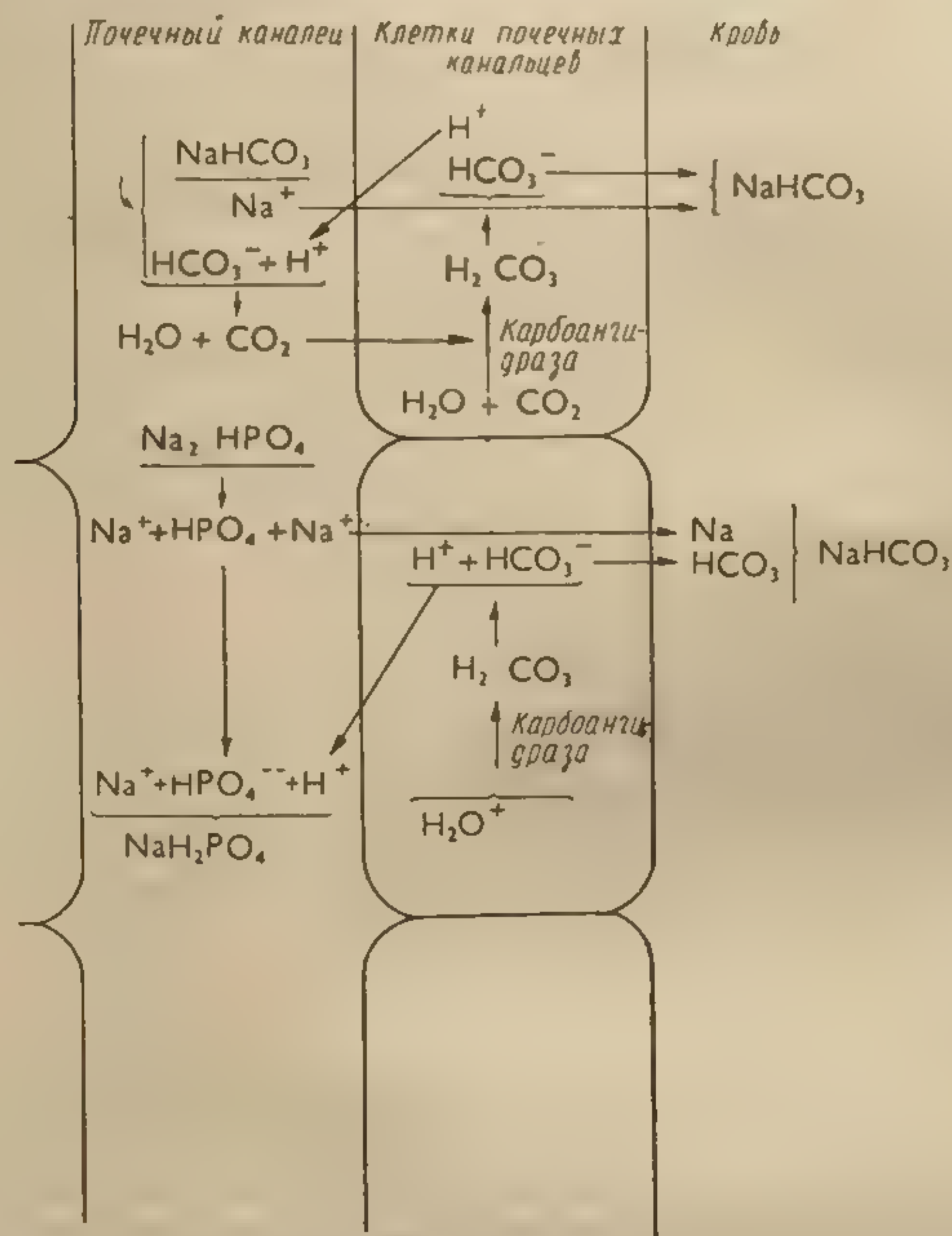


Рис. 66. Механизм действия карбоангидразы.

и монокарбоксильных аминокислот за исключением глицина, третий — только глицина. При известных до настоящего времени врожденных аминоацидуриях (выделение β -амино-изомасляной кислоты, цистинурия, глицинурия, синдром Hartnup, синдром Фанкони), ферментный дефект может касаться одной или больше ферментных систем, обуславливающих реабсорбцию аминокислот, причем этот дефект может не быть абсолютным.

Реабсорбция электролитов, особенно натрия и хлоридов, происходит в противоточной системе собирательных трубок при наличии ферментной системы, обуславливающей активный транспорт натрия. Последний зависит от наличия высокоэнергетических соединений. Ферментная система, будучи источником энергии, необходимой для создания градиента концентрации (между почечным каналцем и окружающей тканью) образует с собирательными трубками противоточную систему мультипликаторов („поворотной-противоточная

множительная система"). Нормальная функция этой системы обуславливает процесс концентрации мочи. Механизм действия ртутных мочегонных препаратов и производных хлортиазида заключается в торможении этой ферментной системы.

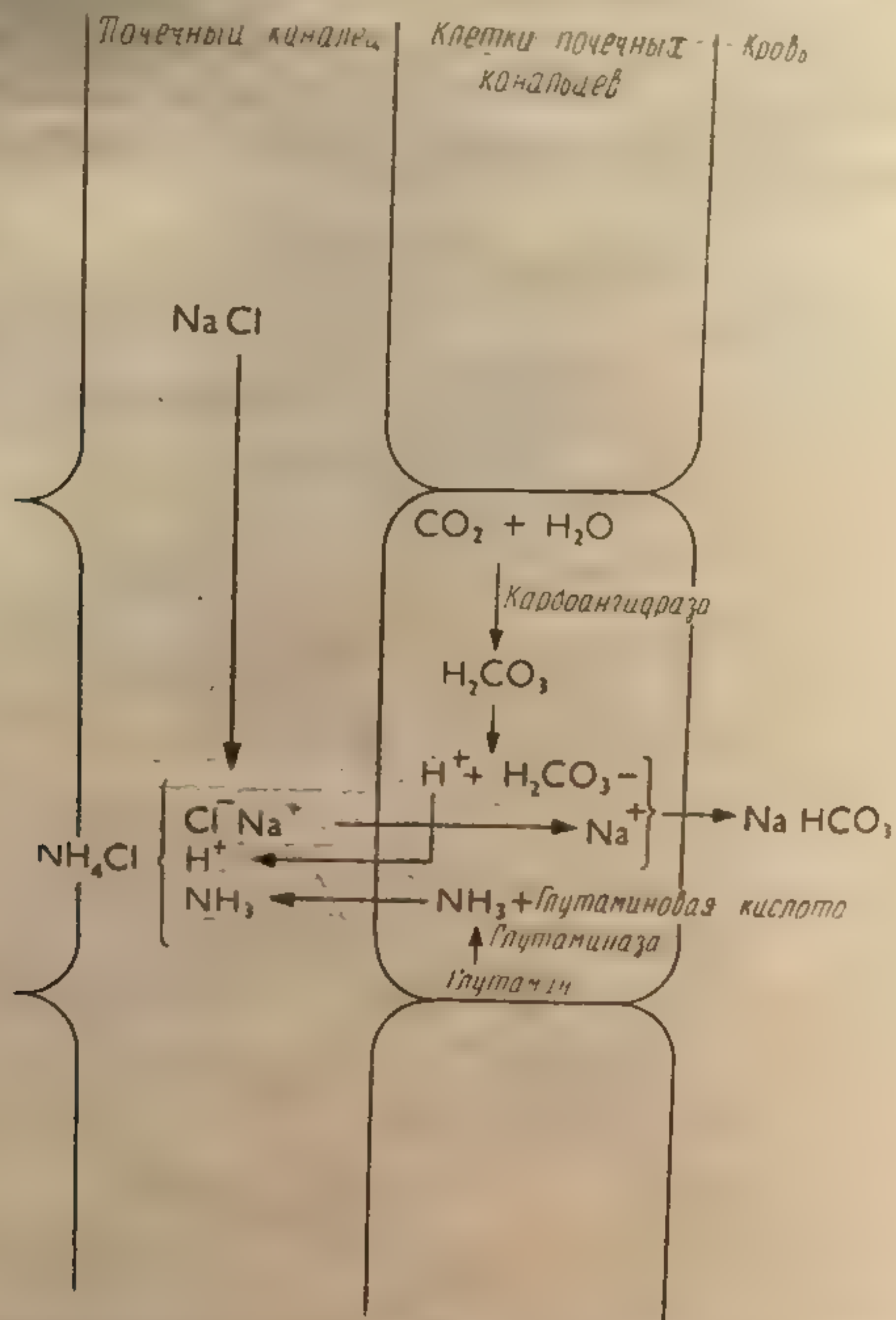
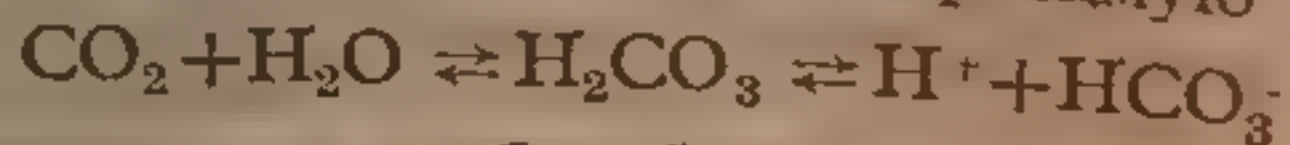


Рис. 67. Механизм образования аммиака и выделения его с мочой.

Реабсорбция воды в прямых канальцах регулируется антидиуретическим гормоном задней доли гипофиза. АДГ активизирует гиалуронидазу прямых канальцев. Эта в свою очередь деполимеризует гиалуроновую кислоту, увеличивает проницаемость канальцев для воды, которая резорбируется физическими силами в гипертоническую окружающую ткань (20, 21, 22).

ВЫДЕЛЕНИЕ АММИАКА И БИКАРБОНАТОВ С МОЧОЙ

В зависимости от качества и количества съеденной пищи, pH мочи может колебаться в широких пределах. Основную роль в этой регуляции играет карбоангидраза и ферменты, принимающие участие в образовании аммиака. Следует подчеркнуть огромные адаптационные способности почек к изменениям среды. Карбоангидраза катализирует обратимую реакцию



Этот фермент ответственен за реабсорбцию профильтрованных в клубочках бикарбонатов и ионов натрия из двуосновных фосфатов и NaCl. Торможение

карбоангидразы, например диамоксом, влечет за собой алкализацию мочи, связанную с утечкой бикарбоната натрия, двуосновного фосфата и NaCl , а также уменьшенное выделение аммиака (смотри схему).

Аммиак, выделенный в просвет прямых канальцев, является результатом действия глутаминазы на глутамин, причем, одновременно образуется свободная глутаминовая кислота. Выделяемый аммиак связывается с ионами водорода и хлора, образовавшимися во время реабсорбции натрия (смотри схему выделения аммиака). Так образуется хлористый аммоний. Для выделения аммиака необходимо наличие карбоангидразы, которая доставляет ионы водорода и хлора. Применение ингибиторов этого фермента влечет за собой описанное уже выше падение выделения аммиака. Развивающийся в организме ацидоз за счет хлористого аммония, хлористого кальция или доставления большого количества белка, резко повышает выделение аммиака. Аминокислоты подвергаются окислительному дезаминированию, а аминные группы соединяются с глутаминовой кислотой в глутамин. Дальнейший цикл обмена глутамина был описан выше.

Местом действия карбоангидразы является прежде всего извитой каналец второго порядка, а глутаминазы — прямой каналец. Знание действия карбоангидразы используется в практике при лечении различного вида отеков (смотри ингибиторы карбоангидразы).

РЕНИН

Это фермент, вырабатываемый в около клубочковых клетках. Его роль как в водно-солевом обмене, так и в регуляции кровяного давления, окончательно не выяснена. Препятствует этому отсутствие методики получения фермента в чистом виде. Данные разных авторов об этом ферменте при почечных и внепочечных заболеваниях часто противоречивы.

Избыточное количество этого фермента обнаружено без сомнения только при злокачественном нефросклерозе. Не закончилась еще дискуссия о том, является ли гипертензионное действие почечных экстрактов таких больных результатом действия ренина, или гипертензия. Читателя, интересующегося этим вопросом, отсылаем к подробным трудам Tobian (52), Page (41) и Peart (42).

ФЕРМЕНТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КРОВИ ПРИ ПОЧЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Ферментные изменения крови, наблюдаемые при заболеваниях почек, могут являться:

- а) результатом проникновения ферментов из поврежденных почечных клеток в кровяное русло;
- б) следствием расстройства выделения ферментов пораженными почками, или,
- в) результатом освобождения ферментов из пораженных других органов, затронутых патологическим процессом одновременно с почками. При экскреторной недостаточности почек часто отмечается увеличение активности амилазы в крови (1). Знакомство с этим фактом может иметь большое значение в дифференциальной диагностике острых заболеваний поджелудочной железы.

Активность щелочной фосфатазы в сыворотке увеличивается в острой фазе диффузного воспаления почечных клубочков (гломерулонефриты) (7). При других заболеваниях почек активность этого фермента остается нормальной (8). Холинэстераза сыворотки крови резко увеличивается при липоидных нефрозах (8, 31, 40 и собственные наблюдения). Увеличение активности этого фермента в крови следует считать результатом усиленной продукции его в печени и следствием невыделения его с мочой (холинэстераза, как высокомолекулярный фермент, не фильтруется в почечных клубочках). В острой фазе гломерулонефрита (7) и при уремических состояниях (38) активность этого фермента падает.

Активность протеаз крови увеличивается в определенном проценте случаев заболеваний почечной паренхимы (23, 44, 45), причем не отмечается никакой корреляции между интенсивностью протеолитических свойств крови и уровнем белкового азота, степенью альбуминурии, реакцией оседания эритроцитов и артериальным давлением крови. Нам кажется, что увеличение количества остаточного азота у некоторых больных не является лишь результатом расстройства экскреторной функции почек, но также следствием увеличения белкового катаболизма у этих больных. Здесь следует вспомнить еще о лейцил-аминопептидазе, активность которой в крови остается нормальной при хронических воспалительных заболеваниях почек (30).

Активность альдолазы сыворотки повышена при нефрозах, остром гломерулонефрите (6, 7), а также при хронических воспалительных заболеваниях почек в фазе роста азотных тел (38). При нефрите с нормальной концентрацией остаточного азота активность этого фермента остается нормальной.

Активность глюкозофосфатизомеразы крови увеличивается при липоидных нефрозах (8), и остается нормальной при генерализованных заболеваниях почечных клубочков и при компенсированных хронических нефритах (6).

Активность лактатдегидрогеназы в сыворотке крови увеличивается примерно в 60% случаев заболеваний почечной паренхимы (53), причем не отмечается никакой корреляции между активностью этого фермента в крови и уровнем внебелкового азота, интенсивностью анемии, протеинурией и гиперхолестеринемией (при нефрозах). Обнаружена зато обратная корреляция между активностью этого фермента и уровнем альбуминов в сыворотке.

Изменения активности трансаминаз при почечных заболеваниях нехарактерны. West и сотрудники (53) установили рост SGOT в 6 случаях из 63 исследованных больных с различными заболеваниями почек. Varaban установил увеличение активности SGOT при липоидном нефрозе (8) при нормальных величинах активности SGPT. Этот же автор установил нормальные величины SGPT и SGOT при острых заболеваниях почечных клубочков (7).

ВЫДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ С МОЧОЙ

Выделенные с мочой ферменты могут быть почечного происхождения или происходят из плазмы крови, подвергаясь фильтрации в почечных клубочках. Почечные клубочки обычно не пропускают белковых тел с молекулярной массой выше 68 тысяч (молекулярная масса амилазы = 45000, уропепсина = 42000, лактатдегидрогеназы = 135000, аланин-аминотрансферазы = 186000, холинэстеразы = 300000). Появление в моче ферментов с молекулярным весом выше 70000 свидетельствует об их почечном происхождении, если принять, что функция клубочков не страдает. Здесь следует еще прибавить, что выделение с мочой низкомолекулярных ферментов

может быть сниженным при одновременно высокой концентрации их в сы-
воротке крови, а именно при расстройстве функции почек.

Лучше всего изучено выделение с мочой амилазы. Активность этого фер-
мента можно обнаружить в каждой нормальной моче. При нормальной функции
почек активность его увеличивается прежде всего при остром панкреатите.
Увеличение активности амилазы имеет место однако также при очень высокой
концентрации мочи (очень важно помнить при дифференциальной диагно-
стике заболеваний поджелудочной железы).

Другим ферментом, который обычно имеется в моче, является липаза
(34, 35, 36). Активность этого фермента увеличивается при острых заболе-
ваниях поджелудочной железы, но в более позднем периоде, чем амилазы.
Определение липолитической активности мочи после введения секретина,
используется некоторыми авторами для диагностики рака поджелудочной
железы (36). У этих больных обычно не отмечается заметного увеличения
липолитической активности мочи после введения секретина.

Активность холинэстеразы (6, 7, 8) и щелочной фосфатазы в моче (7, 8, 29)
вероятно имеет почечное происхождение. При заболеваниях почек изменения
активности этих ферментов нехарактерны, причем не отмечено никакой за-
висимости между их активностью в крови и в моче.

При заболеваниях почек в моче можно обнаружить также альдолазу (6, 7,
8, 28) и глюкозофосфатизомеразу (6, 7, 8). Не отмечается никакой корреляции
их активности в моче со степенью протеинурии и с активностью этих ферментов
в крови, что свидетельствует об их почечном происхождении. В нормальных
условиях в моче или совсем не отмечается (28) активности лактатдегидроге-
назы, или этот фермент имеется лишь в незначительном количестве (5). Фер-
мент этот появляется в моче в относительно большом количестве при про-
теинурии различного происхождения, причем не отмечается линейной зави-
симости его от количества выделяемого белка (5, 12, 28, 48). Исследования
последних лет (25) указывают на то, что при повреждении почек и особенно
базального слоя клубочков, лактатдегидрогеназа, имеющаяся в моче, частично
также происходит из почек.

Трансаминазы в моче или отсутствуют, или имеются лишь в незначительном
количестве (5, 6, 28). При заболеваниях почек, протекающих с протенемией,
количество этих ферментов в моче увеличивается (5, 6, 28).

Относительно хорошо изученным ферментом, выделяемым с мочой, является
уропепсин (смотри литературу, цитированную в статье 18). Этот фермент
продуцируется слизистой оболочкой желудка. Активность его в моче увели-
чивается при язвенной болезни желудка и уменьшается при атрофическом
гастрите (18). Особенно низкое количество этого фермента встречается при
болезни Аддисон-Бирмера и при раке желудка. Гистамин не увеличивает
выделение его с мочой (19). АКТИГ и кортикоиды резко увеличивают его
концентрацию в моче, но лишь при функционально достаточной слизистой
оболочке желудка (13). Выделение уропепсина с мочой усиливается при стрес-
совых положениях (26, 27), поэтому определение этого фермента в моче
может, в условиях нормальной функции слизистой оболочки желудка, слу-
жить в качестве теста функциональной способности коры надпочечников (27).
При определении этого фермента в моче следует каждый раз учитывать
функциональную способность почек, для избежания ошибок в интерпре-
тации результатов (51). Только при достаточной экскреторной функции
почек определение уровня уропепсина в моче имеет диагностическое зна-
чение.

Излагая выделение ферментов с мочой, следует остановиться на рибо-
нуклеазе и урокатепсине. При хроническом гранулоцитарном лейкозе (3, 4)

резко увеличивается выделение рибонуклеазы в суточном количестве мочи. Выделение урокатепсина с мочой мало изучено (цитировано по 1).

Этот фермент, продуцируемый слизистой оболочкой желудка, выделяется в увеличенном количестве при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки.

Среди выделяемых с мочой протеолитических ферментов следует еще вспомнить о лейцинамино-пептидазе и γ -глутамил-транспептидазе (ГГТП). Выделение первого фермента с мочой падает при хроническом пиелонефрите (30). При нефрозе отмечается увеличенная активность ГГТП в моче (39).

Выделение этого фермента уменьшается у больных с диффузным гломеруло-нефритом и злокачественным нефросклерозом (39).

В последнее время интерес онкологов привлекло выделение с мочой β -глюкуронидазы (32). Как известно, отмечается большая, чем обычно, частота новообразований мочевого пузыря у рабочих, имеющих контакт с ароматическими аминами. Оказалось, что не только у больных с новообразованиями мочевого пузыря, но и у здоровых рабочих этих фабрик, выделение β -глюкуронидазы было увеличено. Это стоит в непосредственной связи с величиной экспозиции исследованных рабочих ароматическими аминами. Авторы приписывают β -глюкуронидазе определенную роль в онкогенезе опухолей мочевого пузыря (32).

Интересным фактом является наличие в моче гиалуронат-лиазы (20, 21, 22, 37). Количество ее резко увеличивается после введения АДГ и в моче с высоким удельным весом, и уменьшается после водной пробы. При сахарном диабете выделение этого фермента увеличивается, а при тяжелой почечной недостаточности с уремией падает (37).

С мочой выделяются не только ферменты, но также их ингибиторы и активаторы. Лучше всего изучен выделяемый с мочой ингибитор трипсина. Количество его увеличивается при хронических почечных заболеваниях (49), при беременности и при хронических инфекциях (17). Значение их в патогенезе отдельных заболеваний неясно. Следует также вспомнить об уреазе — активаторе плазмينا, выделяемом с мочой. Выделение уреазы с мочой увеличивается при инфаркте миокарда и острой недостаточности венечных сосудов, и падает при новообразованиях и уремии. Она вероятно является локальным продуктом почек. Ее физиологическая роль не выяснена.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abderhalden R.*: Klinische Enzymologie. G. Thieme Verlag Stuttgart; 1958. — 2. *Albert Z., Orłowski M., Szewczyk A.*: The histological demonstration of gamma-glutamyl-transpeptidase. Nature. — 3. *Aleksandrowicz J., Spier L.*: Arch. Immunol. Terap. Dośw., 1954, 2, 31. — 4. *Aleksandrowicz J., Ostrowska A., Urbanczyk J., Sierko J.*: Haematologica Cracoviensia 1958, 2, 59. — 5. *Amelung D., Horn H. D., Schröder E.*: Klin. Woch. 1958, 36, 963. — 6. *Baraban H.*: Pol. Arch. Med. Wewn., 1961, 31. — 7. *Baraban H.*: Zespołowe badania enzymów w chorobach nerek z uwzględnieniem aktywności w surowicy krwi i moczu. Doniesienie II. Ostre rozlane zapalenie kłębków nerkowych. — 8. *Baraban H.*: Zespołowe badania enzymów w chorobach nerek z uwzględnieniem aktywności w surowicy krwi i moczu. Doniesienie IV. Nerczyce lipidowe. — 9. *Baur H.*: Helv. med. acta., 1955, 22, 414. — 10. *Bonting S. L., Pollak V. E., Muehrcke R. C., Kark R. M.*: J. Clin. Investig. 1960, 39, 1372. — 11. *Bonting S. L., Pollak V. E., Muehrcke R. C., Kark R. M.*: J. Clin. Investig. 1960, 39, 1381. — 12. *Grockson R. A.*: Lancet; 1961, 1, 140. — 13. *Dmowski G.*: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 325. — 14. *Dubach U. C., Recant L.*: J. Clin. Investig. 1960, 39, 1364. — 15. Editorial Lancet; 1961, 1, 92. — 16. *Elkinton J. R., Huth E. J., Webster G. D. Jr., McCance R. A.*: Am. J. Med., 1960, 29, 559. — 17. *Faarvang H. J.*: Acta Endocrinol., 1959, 30, 285. — 18. *Florkiewicz H.*: Pol. Tyg. Lek., Wiad. Lek., 1959, 14, 1425. — 19. *Florkiewicz H.*: Pol. Tyg. Lek., 1960, 15, 1713. — 20. *Гинецинский А. Г. и Иванова Л. Н.*: Докл. Ак. Наук СССР, 1958, 119, 1043. — 21. *Гинецинский А. Г., Закс М. А. и Тумова Л. К.*: Докл. Ак. Наук СССР, 1958, 120, 216. — 22. *Гинецинский А. Г.*: Nature 1958, 182, 1218. — 23. *Gonciarz Z., Kokot F.*: Pol. Tyg.

- Lek. 1961, 16, 564. — 24. Hess R.: Diurese und Diuretica. Internationales Symposzum. Springer-Verlag, Berlin 1959, стр. 121. — 25. Kemp E., Laursen T.: Scand. J. Clin. & Lab. Investig., 1960, 12, 463. — 26. Kędra M., Markiewicz M.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1959, 29, 1479. — 27. Kędra M., Markiewicz M.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1960, 30, 808. — 28. Klaus D.: Klin. Woch. 1958, 36, 207. — 29. Krotkiewski A.: Ref. Symposzum Nefrolog. Wrocław, 2—3. VI. 1961. — 30. Łukasik W.: Ref. Symposzum Nefrol. we Wrocławiu 2—3. VI. 1961.
31. Martin G. J.: Clinical Enzymology, Little, Brown and Comp. Boston-Toronto 1958. — 32. Mattea E., Pietra E.: Minerva medica 1960, 51, 945. — 33. Milne M. D., Asatoor A., Loughbridge L. W.: Lancet; 1961, 1, 51. — 34. Nothman M. M., Pratt J. H., Callow A. D.: AMA. Arch. Int. Med., 1955, 95, 224. — 35. Nothman M. M., Pratt J. H., Callow A. D.: AMA. Arch. Int. Med., 1955, 96, 188. — 36. Nothman M. M., Pratt J. H., Callow A. D.: AMA. Arch. Int. Med., 1957, 100, 221. — 37. Orlikowska W.: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 263. — 38. Orłowski M.: Wiad. Lek. 1958, 11/12, 555. — 39. Orłowski M.: уст. инф. — 40. Orłowski M., Kotlarek Haus S.: Pol. Tyg. Lek. 1958, 13, 1713.
41. Page I. H., Bumpus F. M.: Physiological Review 1961, 41, 331. — 42. Peart W. S.: AMA. Arch. Int. Med. 1959, 107, 347. — 43. Pollak V. E., Bonting S. L., Muehrcke R. C., Kark R. M.: J. Clin. Investig. 1960, 39, 1386. — 44. Richet G., Ardaillou R.: Presse Médicale, 1959, 67, 1229. — 45. Richet G., Villiers H., Ardaillou R.: Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.; 1957, 2, 808. — 46. Richerich R.: Enzymatische Vorgänge bei der Harnbereitung: Biochemie. Diurese und Diuretica. Internationales Symposzum. Springer-Verlag. Berlin, 1959, стр. 91. — 47. Ronsky R., Skala I.: Zschr. Vit.-Horm.-Ferment-forsch., 1960, 11, 273. — 48. Rosalki S. B., Wilkinson J. H.: Lancet; 1959, II, 327. — 49. Safarzyńska-Rybka I.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 604. — 50. Schmuziger P., Pfisterer R., Bächtold H., Truninger B.: Schw. Med. Woch. 1961, 91, 506.
51. Schück O., Gregor O.: Am. J. Dig. Diseases., 1959, 4, 461. — 52. Tobian L.: Physiol. Review.; 1960, 40, 280. — 53. West M., Zimmerman H. J.: J. Lab. Clin. Med., 1958, 52, 185.

ЗАБОЛЕВАНИЯ ЖЕЛЕЗ ВНУТРЕННЕЙ СЕКРЕЦИИ

FRANCISZEK KOKOT

ВНУТРИСЕКРЕТОРНАЯ СИСТЕМА ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Инсулилярная система поджелудочной железы является источником двух, относительно хорошо изученных, гормонов, а именно, инсулина и глюкагона. Оба эти гормона тесно связаны с углеводным обменом. Если на уровне печени действие этих гормонов в смысле продукции гликогена является диаметрально разным, то на уровне мышц они действуют синергически. Несмотря на большое количество статей по этому вопросу, механизм их действия точно не выяснен.

Глюкагон освобождает в печечной клетке АМФ кислоту, которая в присутствии АТФ и ионов магния обуславливает фосфорилирование дефосфофосфориллазы ферментом, называемым дефосфофосфорил-фосфокиназой. Таким образом образуется активная печечная фосфорилаза, увеличивающая разложение гликогена (2, 16, 17).

Механизм действия инсулина заключается в (3, 5, 9, 10, 11, 12, 15, 17):

а) облегчении проникновения глюкозы через клеточную оболочку, что увеличивает усвоение этого вещества;

б) активизации гексокиназы, обуславливающей процесс расщепления глюкозы в цикле Embden-Meyerhof или в пентозном цикле;

в) активации процесса карбоксилирования пирувиноградной кислоты до яблочной кислоты, которая является важным звеном цикла Кребса.

На приложенной схеме представлено современное состояние этой области. Как известно, фосфорилированная глюкоза может расщепляться до пирувиноградной кислоты в цикле Embden-Meyerhof или в пентозном цикле. Пентозный цикл является не только источником физиологически важных пентоз, но также НАДФ·Н₂ (13). В углеводном обмене этот цикл является главным источником редуцированной формы этого нуклеотида. Остальные пути окисли-

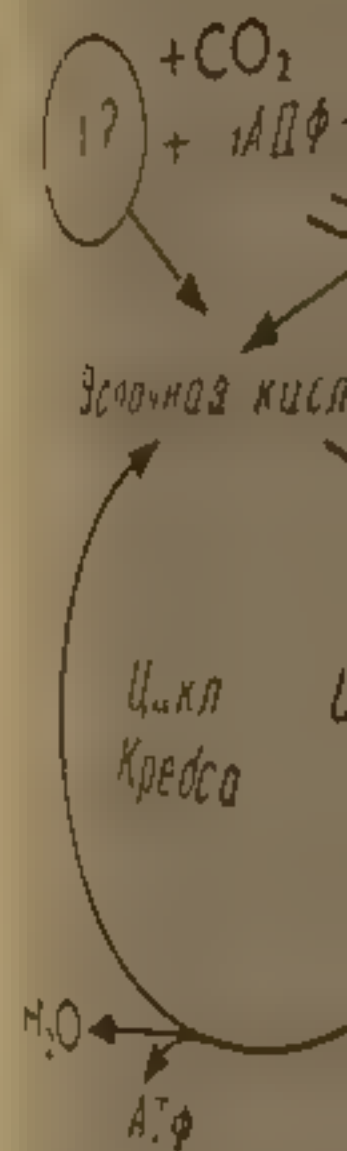
тельного фосфорилирования глюкозы доставляют прежде всего НАД \cdot Н $_2$. Исследования последних лет показали, что НАДФ \cdot Н $_2$ является очень важным соединением в различных метаболических процессах. Так, он необходим в процессе карбоксилирования пировиноградной кислоты в яблочную, которая в свою очередь является важным элементом в цикле Кребса. Однако более важное значение НАДФ \cdot Н $_2$ заключается в его участии в синтезе жирных кислот (9, 11, 14, 15). Он является источником водородных ионов, необходимых для редукции кротонил-КоА в бутирил-КоА.

Недостаточное количество НАДФ \cdot Н $_2$ тормозит синтез жирных кислот на этом уровне, что приводит к аккумуляции ацет-ацетил-КоА, подвергающегося необратимому разложению до свободного кофермента А и ацетоуксусной кислоты, так называемой деацилазой. Это экзотермическая реакция. Ацетоуксусная кислота после редукции с НАД \cdot Н $_2$ образует β -окси-масляную кислоту, а после декарбоксилирования — ацетон. Таким образом образуются кетоновые тела. Недостаток инсулина, тормозя обмен глюкозы путем уменьшения ее фосфорилирования и торможения пентозного цикла, лишает клетку биологически ценного НАДФ \cdot Н $_2$. В результате дефицита инсулина и уменьшения утилизации глюкозы увеличивается катаболизм жиров. Конечным продуктом метаболизма жиров и глюкозы является ацетил-КоА, который подвергается сгоранию в цикле Кребса. Однако не все количество образовавшегося ацетил-КоА сгорает в цикле Кребса. Определенное количество этого продукта подвергается конденсации до ацет-ацетил-КоА, начиная цикл ресинтеза жирных кислот, который происходит исключительно в присутствии НАДФ \cdot Н $_2$. При дефиците инсулина, когда заторможенный пентозный цикл не доставляет достаточного количества НАДФ \cdot Н $_2$, ресинтез жирных кислот не происходит, или происходит лишь в незначительной степени. Ввиду этого дело доходит до образования так называемых кетоновых тел и диабетического ацидоза.

Однако возникает вопрос, почему ацетил-КоА, будучи конечным продуктом катаболизма жирных кислот, не сгорает целиком в цикле Кребса при расстройстве ресинтеза жирных кислот. На этот и многие другие вопросы в настоящее время еще нет достаточно ясного ответа. Несмотря на большие успехи в этой области, известное утверждение, что жиры сгорают в огне углеводов, немного потеряло в своем значении. Изменилась только интерпретация этого явления — связи жирового метаболизма с углеводным, на основании новых достижений биохимии. Критический пункт в нарушении взаимозависимости углеводного и жирового обмена вероятно находится в недостаточном производстве НАДФ \cdot Н $_2$. Цикл Кребса при диабетическом ацидозе функционирует совершенно нормально (5).

Ферментные расстройства, имеющие место в крови и выделяемых организмом веществах при сахарном диабете. Вопрос поведения различных ферментов при сахарном диабете разработан недостаточно. Итак, некоторые авторы сообщают об увеличении активности амилазы в сыворотке крови у диабетиков, тогда, как другие сообщают о падении или нормальной активности этого фермента. Активность холинэстеразы в крови у этих больных нормальна. У некоторых больных отмечается увеличение активности глюкозофосфатизомеразы в сыворотке (1). Довольно интересен факт, отмеченный большинством авторов, а именно, усиленное выделение уропепсина с мочой у диабетиков (4).

Инсулиназа. Факт, что растертые ткани обладают способностью инактивировать инсулин, известен уже больше, чем 30 лет. Несмотря на такой длительный период времени, вопрос о роли и значении инсулиназы, фермента, разлагающего инсулин, остается открытым. Активность этого фермента отме-



чается почти во всех тканях (6, 7). Наибольшая концентрация этого фермента наблюдается в печени. Также и в поджелудочной железе имеется значительное его количество (6). Протеолитические свойства инсулиназы проявляются не только по отношению к инсулину, но также и к целому ряду других белковых

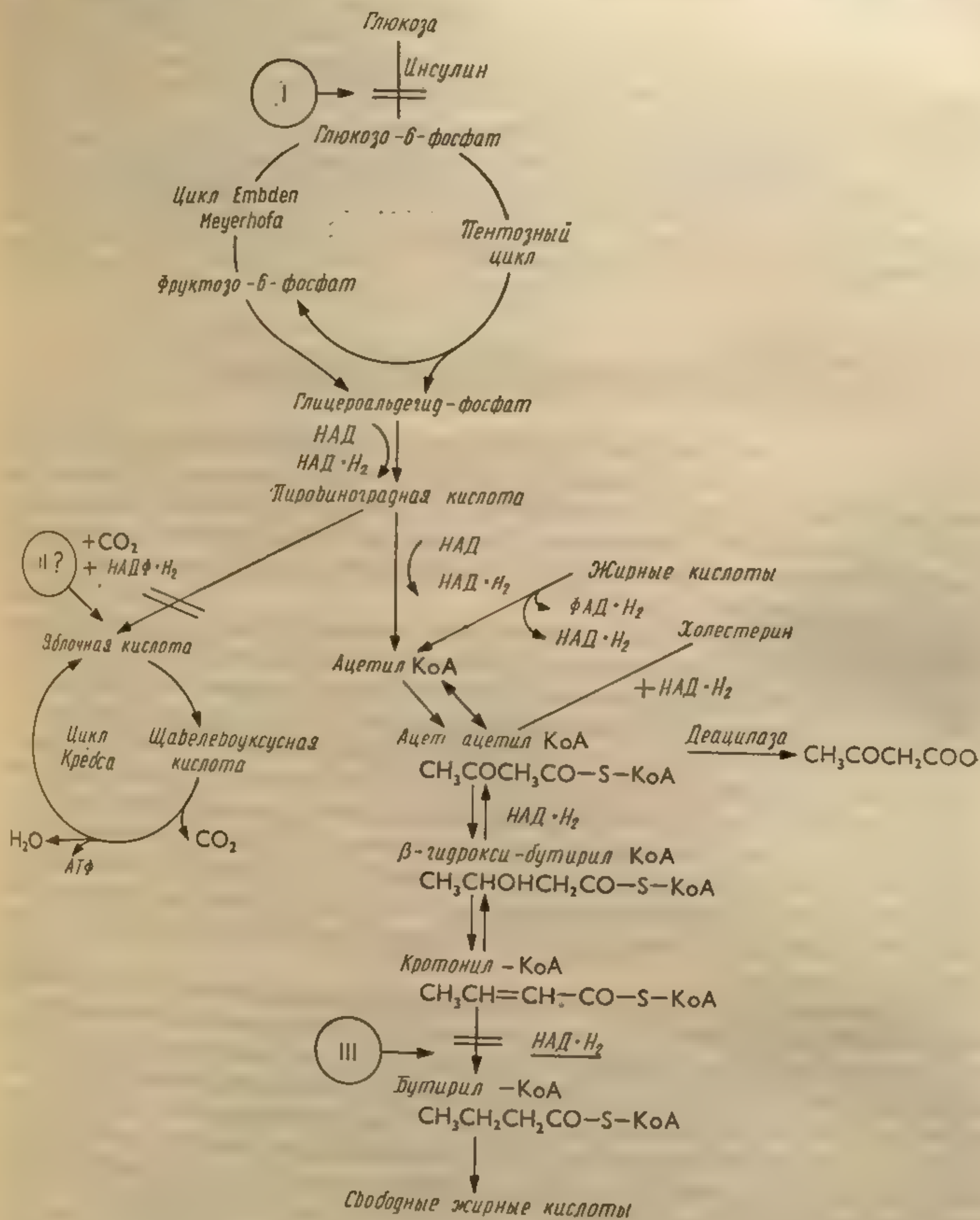


Рис. 68.

субстанций. Активность этого фермента тормозится ингибитором инсулиназы, продуцируемым в печени. Этим фактом объясняется частое ухудшение сахарного диабета при поражении паренхимы печени. Это ухудшение является результатом дефицита ингибитора инсулиназы. Производные сульфонамидов, действующие противодиабетически, тормозят активность этого фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abderhalden R.*: Klinische Enzymologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958. — 2. *Best C. H.*: Metabolic problems involving the pancreas, choline, insulin and glucagon, Ciba Foundation. Tenth Anniversary Symposium on Significant Trends in Medical Research, J. A. Churchill LTD, London 1959, 164. — 3. *Daughaday W. H.*: Arch. Int. Med., 1961, 107, 131. — 4. *Grayzel H. G., Marshall H. B., Elkan B., Sternberg A.*: Diabetes; 1957, 6, 480. — 5. *Krebs H. A.*: Arch. Int. Med., 1961, 107, 119. — 6. *Lewis U. J., Thiele E. H.*: J. Am. Chem. 1957, 79, 759. — 7. *Mirsky I. A., Broh-Kahn R. H.*: Arch. Biochem. 1949, 20, 11. — 8. *Mirsky I. A., Perisutt G., Diengott D.*: Metabolism 1956, 5, 156. — 9. *Passmore R.*: Lancet; 1961, 1, 839. — 10. *Siperstein M. D.*: Diabetes 1958, 7, 181.
11. *Sieperstein M. H.*: Am. J. Medecine 1959, 26, 685. — 12. *Stadie W. C.*: Diabetes; 1958, 7, 173. — 13. *Шонка И. и Ермоленко Р.*: Вопросы медицинской химии 1961, 7, 115. — 14. *Wieland O.*: Zschr. f. Vit.-Horm.-Fermentfor. 1957/1958, 9, 258. — 15. *Williams R. H.*: Arch. Int. Med., 1961, 107, 137. — 16. *Wörner H., Weinges K. F.*: Klin. Woch., 1961, 39, 243. — 17. *Young F. G.*: The nature and mechanism of action of hormones. Ciba Foundation. Tenth Anniversary Symposium on Significant Trends in Medical Research. J. A. Churchill, London, 1959, 135.

ПАРАЩИТОВИДНЫЕ ЖЕЛЕЗЫ

Паращитовидные железы продуцируют белковый гормон, лишенный цистина, с молекулярной массой 9500 (6). Этот белок состоит из одной полипептидной цепи, которая, даже после частичного гидролиза, не теряет целиком своей биологической активности. Выделение этого гормона регулируется уровнем кальция в крови. Роль уровня фосфора с этой точки зрения окончательно не выяснена.

В настоящее время уже не остается никакого сомнения в том, что *parathormon* Collip влияет на кальциевый обмен, действуя прежде всего на кости (2, 4, 6). Согласно Neuman и сотрудникам (5) этот гормон повышает активность остеобластов, тормозя их цитратдегидрогеназу путем разрушения кофактора этого фермента, которым является НАДФ. Таким образом дело доходит до кумуляции лимонной кислоты на поверхности отложений кальция и мобилизация кальция, который проникает в кровяное русло. Следует отметить, что обнаружена положительная корреляция между уровнем кальция и лимонной кислоты в крови. Менее изучено влияние гормона паращитовидных желез на метаболизм кальция на уровне почек, желудочно-кишечного тракта и молочной железы. Интересно, что дефицит его резко усиливает выделение кальция с молоком.

Нам кажется, что этот гормон оказывает также непосредственное влияние на метаболизм фосфора, и то на уровне почек. Он увеличивает выделение фосфатов через почечные каналцы, при этом совершенно не нарушая реабсорбции этих солей (в проксимальном отделе почечных каналцев фосфаты почти целиком подвергаются реабсорбции). При диагностике как гиперфункции, так и гипофункции паращитовидных желез большую помощь может оказать определение активности щелочной фосфатазы в крови. При гиперфункции этих желез кроме классической гиперкальциурии, гиперфосфатурии, гипофосфатемии и гиперкальцемии отмечается более или менее выраженный рост активности щелочной фосфатазы, что свидетельствует об усиленной активности остеобластов и остеокластов. Рост активности этого фермента имеет место, однако, только при выраженных костных изменениях. В исключительных случаях отмечается также увеличение активности кислой фосфатазы. После удаления аденомы или рака паращитовидных желез, активность щелочной фосфатазы в крови падает до нормальных величин.

При вторичном гиперпаратиреонизме (1, 3), развившемся в результате хронических заболеваний почек, увеличение активности щелочной фосфатазы отмечается только в половине случаев. Гипофункция паращитовидных желез протекает с пониженной активностью щелочной фосфатазы в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abderhalden R.*: Klinische Enzymologie, G. Thieme Verlag—Stuttgart, 1958, 64. — 2. *Ammann R., Dirscherl W.*: Fermente-Hormone-Vitamine, Bd. II. G. Thieme Verlag—Stuttgart; 1960, 145. — 3. *Martin G. J.*: Clinical enzymology. Little, Brown and Company Boston—Toronto 1958, 174. — 4. *Munson P. L.*: Fed. Proceed., 1960, 19, 593. — 5. *Neuman W. F., Fischein H., Chen P. S., Mulryan B. J., Di Stefano V.*: J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 3863. — 6. *Rasmussen H.*: Am. J. Med. 1961, 30, 112.

ЩИТОВИДНАЯ ЖЕЛЕЗА

Эта железа относится к одному из наиболее хорошо изученных с точки зрения физиологии и биохимии органов внутренней секреции. Мы остановимся на:

- а) биогенезе и метаболизме гормонов щитовидной железы;
- б) механизме действия этих гормонов;
- в) ферментативных изменениях в крови и различных органах, наблюдаемых при гиперфункции щитовидной железы;
- г) врожденных и приобретенных расстройствах биогенеза гормонов щитовидной железы;
- д) *antithyreotica* и механизме их действия.

Биогенез и метаболизм гормонов щитовидной железы:

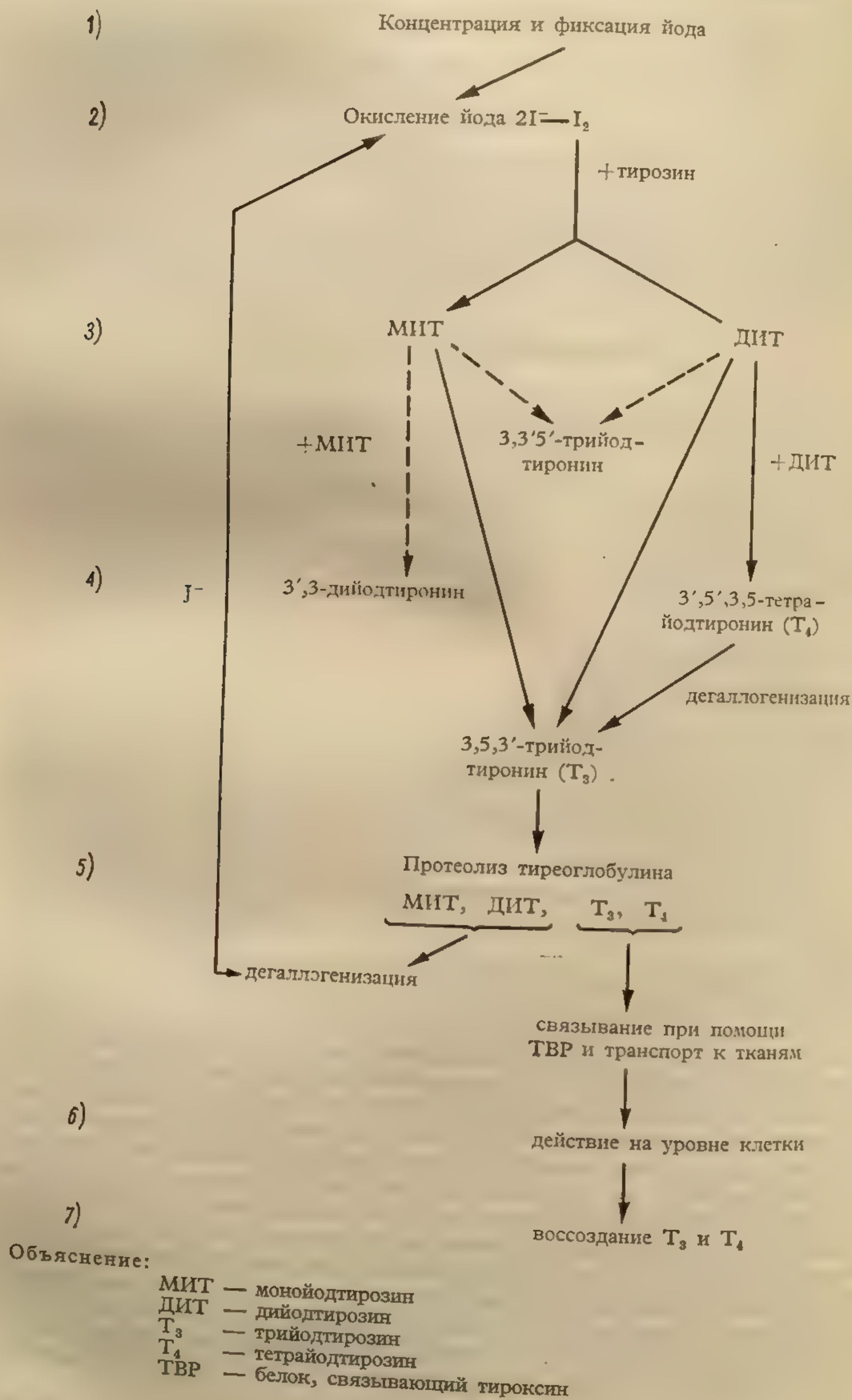
1. Биосинтез гормонов (5, 18, 26) начинается от концентрации и фиксации ионов йода (I^-) этой железой (смотри схему). Процесс фиксации контролируется ферментативно и зависит от наличия кислорода и сульфгидриловых групп. Роданиды и соли хлорной кислоты тормозят накопление йодида в щитовидной железе. Процесс фиксации и концентрации йодида усиливается под влиянием тиреотропного гормона.

2. Следующий этап биосинтеза заключается в окислении йодистых солей до молекулярного йода. Этот процесс происходит при наличии фермента типа пероксидазы, называемой йодазой. Его тормозят производные тиомочевины.

3. В свою очередь, молекулярный йод используется для йодирования молекул тирозина, вмонтированных в белок — тиреоглобулин. Процесс галлогенизации начинается вначале при углероде C_3 , а затем C_5 бензойного кольца. Так образуется монойодтирозин (МИТ) и дийодтирозин (ДИТ). Процесс галлогенизации усиливается в присутствии ионов меди (эти ионы инактивируют ингибитор йодазы). НАДФ, НАДФ· H_2 и глюкозо-6-фосфат также усиливают процесс галлогенизации. МИТ и ДИТ, входящие в состав тиреоглобулина, не подвергаются дегаллогенизации имеющейся в щитовидной железе дегаллогеназой (в отличие от свободного, не связанного с тиреоглобулином МИТ и ДИТ, легко подвергающихся этому процессу).

4. Четвертый этап образования гормона щитовидной железы заключается в конденсации двух молекул ДИТ или одной молекулы ДИТ и одной МИТ с образованием тироксина (T_4) или трийодтиронина (T_3). Не исключается, что T_3 возникает путем дегаллогенизации T_4 . Однако у человека не обнаружено 3',3'-дийодтиронина и 3,3'5'-трийодтиронина, которые теоретически тоже могли бы образоваться на этом этапе (смотри схему). Кроме перечислен-

БИОГЕНЕЗ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ



ных тиронинов одновременно образуется аминопропионовая кислота. Процесс конденсации йодтирозинов может являться результатом действия ферментов, хотя этот процесс может являться результатом соответствующего пространственного расположения МИТ и ДИТ в молекуле тиреоглобулина. Этим путем образуется окончательный тиреоглобулин, готовый к отщеплению T_4 и T_3 .

5. В этом процессе отщепления T_4 и T_3 , обусловленного наличием протеаз и пептидаз, освободившиеся тирониновые гормоны немедленно связываются белком сыворотки крови, называемым ТВР (*Thyroxine binding protein*). Протеолиз захватывает также МИТ и ДИТ, связанные с тиреоглобулином. Однако эти соединения сразу же после освобождения подвергаются дегаллогенизации, а образовавшийся йод и тирозин могут быть снова использованы в процессе образования T_3 и T_4 . Процесс дегаллогенизации нуждается в присутствии НАДФ \cdot H_2 . В физиологических условиях почти весь йод крови связан с белком и осаждается с ним после прибавления трихлоруксусной кислоты, реактива Somogyi и так далее. Поэтому обычно говорят об йоде, связанном с белком (*PBI-protein bound iodine*). Осажденный с белком йод можно экстрагировать бутанолом (*butanol extractable iodine*).

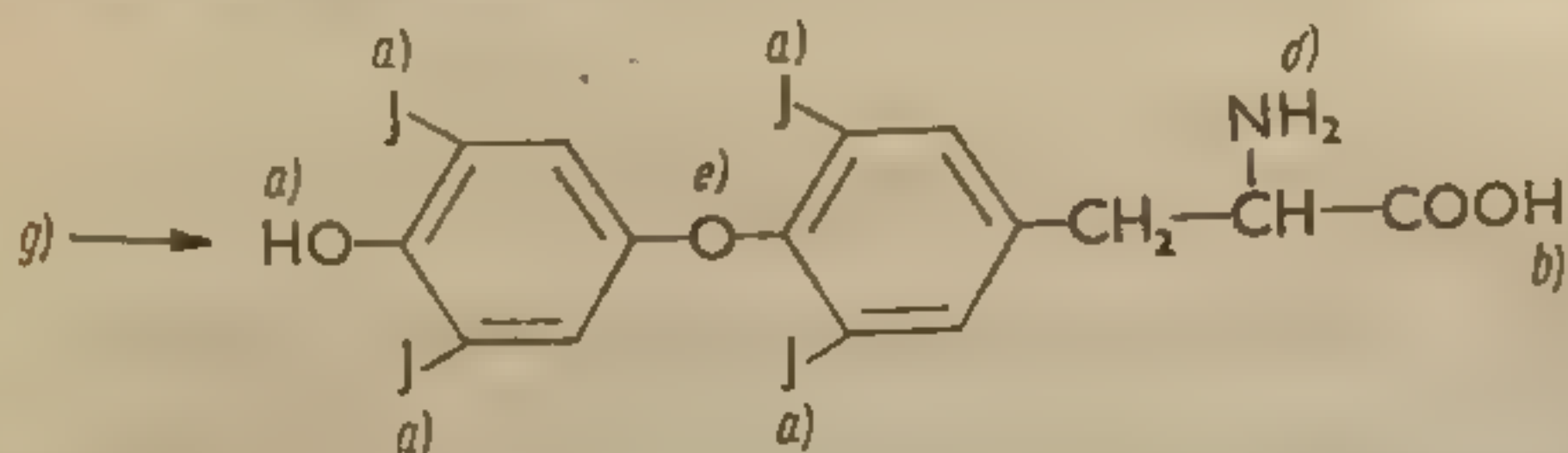
Бутаноловый экстракт содержит йод, связанный с аминокислотами, которые вероятно не связаны пептидными связями с белками. В него входят в первую очередь тирониновый йод (T_3 , T_4). Отсюда в физиологических условиях, йод, связанный с белком (PBI), практически равен тироксиновому и трийодтироксиновому йоду. В патологических условиях могут освобождаться йодированные аминокислоты, связанные с тиреоглобулином. Отсюда, определяя йод, связанный с белком и йод, экстрагирующийся бутанолом, можно уловить некоторые нарушения биогенеза этих гормонов. ТВР является белком, перемещающимся при электрофорезе на бумаге со скоростью, промежуточной между α_1 и α_2 глобулином. При насыщении этой белковой фракции, T_3 и T_4 могут связаться с альбуминами или в незначительной степени с предальбуминовой фракцией (7).

Концентрация ТВР увеличивается особенно при беременности, при лечении эстрогенами, гиперфункции щитовидной железы, при заболеваниях печени (4), а также у новорожденных. Сродство T_3 к ТВР гораздо меньше, чем T_4 . Поэтому освобождение T_3 является более быстрым, а период полураспада его более коротким, чем T_4 .

6. О механизме действия гормонов смотри под б.

7. Метаболизм T_3 и T_4 заключается в (5, 18):

- а) дегаллогенизации,
- б) окислительном дезаминировании,
- в) декарбоксилировании,
- г) эстерификации с глюкуроновой кислотой,
- д) окислении фенольной группы и
- е) разрыве эфирной связи.



В физиологических условиях йод выделяется преимущественно с мочой в виде солей йода. Выделение йодированных аминокислот следует считать патологическим симптомом. Печеночно-кишечная циркуляция имеет небольшое физиологическое значение.

Механизм действия гормонов щитовидной железы (13, 18, 25, 26). Несмотря на многочисленные исследования в этой области, механизм действия гормонов щитовидной железы окончательно не выяснен. Биологически активной субстанцией является T_3 или дальнейший продукт ее обмена.

Доказано почти с полной уверенностью, что тироксин не является тем гормоном щитовидной железы, который действует на уровне клетки (28). Освобождение T_3 и T_4 из ТВР зависит от уровня его в крови и от факторов, обуславливающих их освобождение на уровне клетки. Неизученный еще метаболит T_4 и T_3 должен вмешиваться в процессы окислительного фосфорилирования таким образом, что освобожденная в процессе этой реакции энергия не накапливается в виде высокоэнергетических соединений, а рассеивается в виде тепла. Не исключается, что гормоны щитовидной железы, обладая большими способностями связывания биологически активных микроэлементов (Mn, Co, Mg, Zn, Ca), этим путем вмешиваются в ферментативные процессы. Другие ученые видят в гормонах щитовидной железы регуляторов проницаемости клеточных оболочек по отношению к различным субстратам, что оказывает влияние на обмен веществ.

Ферментативные изменения в крови и разных органах, можно обнаружить как при гиперфункции, так и при гипофункции железы. Pitt-Rivers и Tata (18) пишут о поведении 22 ферментов или ферментных систем при этих заболеваниях. Этим конечно не исчерпывается список всех изменений, происходящих в действительности в ферментных системах при этих патологических состояниях (1, 2, 10, 11, 18). Эти изменения не зависят от стадии заболевания. Если учесть, насколько далеко заходят морфологические изменения в мышцах, скелете и паренхиматозных органах как при Базедовой болезни, так и при слизистом отеке, то обнаружение тех или других нарушений в ферментах крови и в различных органах не явится неожиданностью.

Особенно следует подчеркнуть ферментативные процессы, происходящие в эритроцитах или лейкоцитах (12, 17), а также внутренних органах (24) при гиперфункции щитовидной железы. Если дальнейшие исследования, проводимые в этом направлении, подтвердят их специфический характер, то это может иметь большое практическое значение в диагностике гиперфункции щитовидной железы, особенно в случаях с неполной клинической картиной, а также в наблюдении за динамикой развития заболевания в „пробирке“.

Врожденные и приобретенные расстройства биогенеза гормонов щитовидной железы (4, 5, 18, 25, 26). Blizzard (5) делит врожденные ферментные или метаболические дефекты щитовидной железы на следующие группы:

1. Дефекты синтеза гормонов щитовидной железы:
 - а) дефект в концентрировании и фиксировании йодида в щитовидной железе;
 - б) неспособность окисления йодида до J_2 ;
 - в) ферментная блокада, делающая невозможным образование йодированных производных тирозина (16);
 - г) ферментная блокада, делающая невозможным конденсацию двух молекул йодтирозина (21);
 - д) торможение протеолиза йодтирозинов и йодтиронинов из тиреоглобулина;
 - е) освобождение из щитовидной железы патологического тиреоглобулина или субстанции, с ним сходной (27);
 - ж) расстройства дегаллогенизации свободных йодтирозинов (6).

II. Дефекты связывания йода белком.

а) чрезмерное количество ТВР?

б) сниженное количество ТВР?

III. Дефекты, касающиеся расстройства метаболизма гормонов щитовидной железы.

Из представленной выше классификации следует, что расстройства нормального биогенеза метаболизма гормонов щитовидной железы могут развиваться на уровне их биосинтеза в этой железе, на уровне транспорта гормонов из щитовидной железы до эффектора, и даже на уровне самой клетки, метаболизирующей эти гормоны. Если расстройства биосинтеза гормонов щитовидной железы относительно хорошо изучены, то остальные расстройства изучены только частично. В изучении этих первых помогла прежде всего хроматография меченных J^{131} соединений, полученных из щитовидной железы, крови или мочи (радиохроматография). Она объяснила много неясных до настоящего времени вопросов гипofункции щитовидной железы, протекающей с нормальным количеством ТВР. Среди приобретенных ферментных дефектов, наблюдаемых в биосинтезе гормонов щитовидной железы, следует вспомнить о расстройстве протеолиза тиреоглобулина, проникающего из этого органа в кровяное русло в неизменной форме при некоторых воспалительных заболеваниях (5), раке щитовидной железы (20), а также после применения с терапевтической целью J^{131} (3). Кроме того, при гиперфункции щитовидной железы (8,22) и раке этого органа (13), в некоторых случаях отмечается образование в щитовидной железе трийодтиронина как основного гормона (в нормальных условиях 95% гормонов щитовидной железы составляет тироксин). Эти последние случаи свидетельствуют о нарушении биосинтеза гормонов щитовидной железы при патологических состояниях.

Antithyreotica. К наиболее широко применяемым лекарственным веществам при гиперфункции щитовидной железы следует отнести йод в виде Люголевской жидкости, йодистого калия, производные тироурацила (метил- и пропил-тироурацил), а также производные имидазола (меркаптометилимидазол-Тапазол и 2-карбоекситио-1-метилоимидазол-Неомерказол).

Механизм действия йода изучен недостаточно. Предполагается, что йод, вводимый в больших количествах, действует угнетающе на все этапы биосинтеза гормонов щитовидной железы (цитировано по 14). Перхлорат калия или натрия, а также роданиды, делают невозможным концентрацию и фиксацию йодида в щитовидной железе (9,19). Во время лечения этими препаратами введение йода абсолютно противопоказано. Если у больного перед операцией применяют йод, а делают это очень часто, то при предварительной подготовке больного солями хлорной кислоты у него может развиваться тиреотоксический криз еще перед операцией. Производные тироурацила (9, 19, 23) и, вероятно, производные имидазола, прежде всего тормозят процесс йодирования тирозина. Их лечебный эффект можно свести на нет только препаратами тироксина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abderhalden R.: Klinische Enzymologie, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1958. — 2. Bartlett W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1937, 36, 843. — 3. Benau R. S., Dobyns B. M.: J. Clin. Endocrinol. 1955, 15, 118. — 4. Beraud T.: Acta Endocrin., 1960, 35, Supp. 55. — 5. Blizzard R. M.: Metabolism 1960, 9, 232. — 6. Choufoer I. C., Kassenaar A. A. H., Querido A.: J. Clin. Endocrinol., Metab., 1960, 20, 983. — 7. Christensen L. K., Litonjua A. D.: J. Clin. Endocrinol., Metab., 1961, 21, 104. — 8. Hales I. B., Dobyns B. M.: J. Clin. Endocrin., Metab., 1960, 20, 68. — 9. Hart K. T., Druet D., Bauer M. A., Mack R. E.: J. Lab. Clin. Med., 1961, 57, 428. — 10. Hess B., Gehm R.: Klin. Woch., 1955, 33, 91.

11. Keller N., Pfister H.: Zschr. inn. Med., 1955, 10, 735. — 12. Kurland G. S., Krotkov M. V., Freedberg A. S.: J. Clin. Endocrinol., Metab., 1960, 20, 35. — 13. Mack R. E., Hart K. T., Druet D., Bauer M. A.: Am. J. Med. 1961, 30, 323. — 14. Oppenheimer J. H., Mc Pherson H. T.: Am. J. Med., 1961, 30, 281. — 15. Owen C. A. Jr. Mc, Conakey W. M.: J. Clin. Endocrinol., 1956, 16, 1570. — 16. Parker R. H., Beirwaltes W. H.: J. Clin. Endocrin., Metab., 1961, 21, 21. — 17. Pearson H. A., Druyan R.: J. Lab. Clin. Med., 1961, 57, 343. — 18. Pitt-Rivers R., Tata J. R.: The thyroid Hormones Pergamon Press, London, 1959, — 19. Richards J. B., Ingbar S. H.: Endocrinology 1959, 65, 198. — 20. Rabbits J., Rall J. E., Rawson R. W.: J. Clin. Endocrin., 1955, 15, 1315.

21. Rupp J. J., Chavarria-Bonique C., Paschkis K. E.: Metabolism 1960, 9, 427. — 22. Rupp J. J., Paschkis K. E.: Am. J. Med., 1961, 30, 427. — 23. Slingerland D. W., Graham D. E., Josephs R. K., Mulvey P. F. Jr., Trakas A. P., Yamazaki E.: Endocrinology, 1959, 65, 178. — 24. Tata J. R.: Acta Endocrinol., 1961, 37, 125. — 25. Thompson R. H. S., King E. J.: Biochemical disorders in human disease J. A. Churchill Ltd. London; 1959, 289-351. — 26. Werner S. C.: The thyroid, P. B. Hoeber Inc., N. Y. C., USA, 1955, 96. — 27. Werner S. C., Block R. J., Mandl R. H.: J. Clin. Endocrinol., Metab., 1960, 20, 205. — 28. Wilkinson J. H., Sprott W. E., Bowdon C. H., MacLagan N. F.: Biochem. J. 1954, 56, 215.

НАДПОЧЕЧНИКИ

КОРА НАДПОЧЕЧНИКОВ

1. Биогенез гормонов коры надпочечников в сокращенном виде приведен на схеме. Исходным материалом для синтеза всех стероидов (андрогенов и эстрогенов тоже) является холестерин (10, 15, 16, 19, 28, 34). Холестерин подвергается ферментативной перестройке в изокапроновую кислоту и прегненолон, причем происходит гидроксилирование при углероде C_{21} . Этот процесс, наблюдаемый в яичках, яичниках и надпочечниках, нуждается в присутствии АТФ и НАД. Биогенез стероидов из холестерина регулируется АКТГ. Существует еще и другой, независимый от АКТГ, путь синтеза прегненолона или прогестерона, непосредственно из уксусной кислоты. Однако в физиологических условиях этот путь не имеет практического значения. В свою очередь прегненолон подвергается превращению под влиянием специфического фермента, называемого 3- β -гидрокси-дегидрогеназа, в прогестерон. Согласно современным взглядам на стероидогенез, прегненолон, или прогестерон являются основными элементами для синтеза всех, известных до настоящего времени, биологически активных стероидов. Дальше обмен прогестерона в надпочечниках может идти в 3 основных направлениях:

- а) продукции филогенетически наиболее старой группы стероидов, то есть половых гормонов;
- б) продукции гормонов, регулирующих водно-солевой обмен;
- в) продукции филогенетически наиболее молодой группы стероидов, то есть 17-гидроксистероидов.

В физиологических условиях примерно 2/3 выделенных с мочой 17-КС происходит из надпочечников. Эта фракция включает метаболиты половых гормонов, продуцируемых в коре надпочечников, а также 17-КС, являющихся продуктом обмена 17-ОН (17-гидрокси) стероидов.

Ко второй группе гормонов надпочечников прежде всего относится дезоксикортикостерон (ДОК), кортикостерон и альдостерон; они играют основную роль в регуляции водно-электролитного обмена. ДОК образуется в результате 21-гидроксилирования прогестерона. В результате 11-гидроксилирования ДОК образуется кортикостерон, а из него, после окисления углерода C_{18} — альдостерон.

Наибольшую группу кортикоидов надпочечников составляют 17-ОН стероиды. Принято считать, что очередность гидроксиляции прогестерона при

определенных углеводах точно детерминирована. В первой фазе происходит гидроксилирование C_{17} , во второй C_{21} , и лишь в конце C_{11} . В последнее время однако установлено, что гидроксилирование C_{11} может наступить непосредственно после гидроксилирования C_{17} .

Обмен стероидов в основном заключается в редукции кольца А или В с образованием алкогольной группы при C_3 , с последующей этерификацией ее с глюкуроновой или серной кислотой. Большинство продуцируемых надпочечниковых ОН-стероидов выделяется с мочой в виде тетрагидрокортизона, а лишь незначительная часть реставрируется до производных андростана.

Так же, как 17-ОН стероидов, представляется обмен альдостерона, который в большинстве своем выделяется как эфир тетрагидроальдостерона. Надпочечниковые половые гормоны подвергаются редукции до производных андростана, а затем этерификации при C_3 . Лишь незначительная часть перечисленных стероидов выделяется с мочой в неизмененном виде.

2. Механизм действия стероидов и их влияние на разные ферменты. Истинные гормоны коры надпочечников (не учитывая половых гормонов) необходимы для нормальной жизнедеятельности человеческого организма. Их многостороннее влияние на, практически, все процессы обмена в организме, заставляет считать, что они вмешиваются в одно основное звено клеточного метаболизма, необходимое для нормальной жизнедеятельности клетки. Это звено прежде всего связано с продукцией энергии, скрытой в форме высокоэнергетических соединений. Возможно, что основное значение кортикоидов заключается в регуляции процессов фосфорилирования, а совершающиеся другие биохимические изменения являются только их следствием (2).

Влияние 17-ОН стероидов на разные ферментные системы является предметом многочисленных сообщений (1, 5, 9, 11, 12, 31, 35). Нередко они противоречат друг другу, что зависит от исследования одного и того же явления часто в разных условиях. Число клинических сообщений относительно влияния глюкокортикоидов на активность различных ферментов в крови к сожалению очень невелико. Valk и Owens (35) сообщают об угнетающем влиянии кортизона на активность кислой фосфатазы сыворотки крови у больных с метастазами рака предстательной железы в кости. Adams и сотрудники (1) обнаружили рост активности пептидазы в крови у больных болезнью Кушинга. Лучшее всего изучено влияние 17-ОН стероидов на выделение пепсина слизистой оболочкой желудка и выделение уропепсина с мочой (5, 9, 12). При здоровых почках и нормально функционирующей слизистой оболочке желудка, 17-ОН стероиды резко повышают выделение уропепсина. При гипофункции слизистой оболочки желудка (рак желудка, болезнь Аддисона-Бирмера), уропепсина выделяется мало, иногда в количествах едва определимых, а стероиды не изменяют выделения его с мочой. При нормальной функции почек и слизистой оболочки желудка выделение уропепсина может служить тестом функциональной способности надпочечников (22). При гипофункции коры надпочечников выделение уропепсина снижено.

3. Врожденные ферментные дефекты в биогенезе 17-ОН стероидов. В этой группе заболеваний лучше всего изучен надпочечниково-половой синдром. Сущность этого патологического синдрома заключается в нарушении гидроксилирования прогестерона (3, 6). Различаются три основные формы этого синдрома:

- а) компенсированная форма (6, 8),
- б) форма с потерей соли (4, 7),
- в) форма с гипертонией (13).

Рассмотрим по очереди патомеханизм отдельных форм этого синдрома. Основным ферментным дефектом как компенсированной формы, так и формы

с потерей соли, является отсутствие 21-гидроксилирования прогестерона. В результате этого (смотри схему биогенеза стероидов) образовавшийся 17-гидрокси прогестерон не может подвергнуться дальнейшему обмену в 17-гидрокс ДОК и кортизол, а редуцируется до прегнантриола. Дефицит кортизола в крови побуждает подбугорье и, косвенно, переднюю долю гипофиза, к усиленной продукции АКТГ. АКТГ в свою очередь усиливает продукцию пренанолон или прогестерона, который, однако, не может быть использован в правильном направлении, то есть для производства кортизола. Значительные количества прогестерона превращаются в прегнантриол и производные андростана. Эти последние являются причиной вирилизации у особей женского пола и преждевременного развития половых органов у особей мужского пола. При определении 17-ОН стероидов способом Porter-Silber в крови вообще не обнаруживаются хромогенов (этим способом обнаруживаются стероиды с боковой цепью $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-\text{C}-\text{OH}$). В моче этих больных кроме боль-

шого количества 17-КС и прегнантриола обнаруживается также незначительное количество 11-кето-прегантриола, что может свидетельствовать о возможности 11-гидроксилирования перед гидроксилированием углерода C_{21} .

Увеличение концентрации АКТГ у этих больных кроме того приводит как к гипертрофии коры надпочечников, так и к пигментации кожи (как при болезни Аддисона). При компенсированной форме надпочечниково-полового синдрома отсутствие 21-гидроксилирования не является абсолютным. Хотя количество продуцируемых у этих больных глюкокортикоидов невелико, но еще достаточно для нормальной жизнедеятельности. Продукция альдостерона у них чаще всего нормальна.

У 1/3 больных с данным синдромом отмечаются симптомы чрезмерной потери соли с мочой. У этих больных 21-гидроксилирование совершенно отсутствует, что влечет за собой выпадение продукции минералокортикоидов (8). Это утверждение противоречит утверждениям других авторов (29), которые отмечали увеличение выделения альдостерона при описываемом синдроме. Наблюдения этих авторов могли бы также свидетельствовать о существовании другой, чем альдостероновая, регуляции водно-электролитного обмена, или могли бы свидетельствовать о пермиссионном действии кортизола по отношению к альдостерону. Полное отсутствие кортизола у этих больных должно было бы сделать невозможным действие альдостерона. Кроме того, не исключена возможность чрезмерной продукции у этих больных какого-то натриуретического гормона. Больные эти выделяют с мочой избыточное количество 17-КС, прегнантриола, 17-гидроксипреганолон и 11-кето-прегантриола. Последний имеется в моче в очень большом количестве. В других отношениях больные группы а ничем не отличаются от больных группы б.

Из вышесказанного вытекает, что имеется лишь количественная, а не качественная разница между больными с компенсированной формой и с формой, протекающей с потерей соли. Разница заключается лишь в степени выпадения процесса 21-гидроксилирования.

Сущность синдрома, протекающего с гипертонией, заключается в отсутствии 11-гидроксилирования прогестерона. Отсутствие фермента, ответственного за процесс 11-гидроксилирования, приводит к чрезмерной продукции дезоксикортикостерона, что приводит к артериальной гипертонии. Одновременно в надпочечниках вырабатывается большое количество 17-ОН ДОК (субстанция S. Reichsteina) который затем проникает в кровь. В печени субстанция S подвергается редукции до тетрагидро-S и прегнано-3- α , 17- α , 20- α , 21-тетрола, удаляемых затем с мочой. Реакцией Porter-Silber можно обнаружить хромоген в крови, так как субстанция S. Reichstein содержит необходимую для

этой реакции группировку $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CO}-\text{C}-\text{OH}$. У этих больных с мочой вы-

деляется гораздо меньше pregnантриола, чем при описанных выше формах надпочечниково-полового синдрома. В моче этих больных имеются также метаболиты ДОК, а именно тетрагидро-ДОК. Так как дефицит 11-гидроксилирования не всегда бывает абсолютным, в моче этих больных количество альдостерона снижено.

Из сказанного выше можно сделать вывод, что гипертрофия надпочечников у этих больных является результатом чрезмерной продукции АКТГ, вызванной отсутствием тормозящего действия кортизола. Ввиду гиперпродукции АКТГ продуцируется избыточное количество андрогенов, вызывающих симптомы вирилизации. Применение у этих больных кортизола или его производных, тормозя выделение АКТГ гипофизом, ликвидирует как чрезмерную продукцию андрогенов, так и усиленную продукцию ДОК. Таким образом исчезают симптомы вирилизации у особей женского пола и преждевременного развития половых органов у особей мужского пола. Также и кровяное давление возвращается к норме.

Надпочечниково-половой синдром генетически обусловлен дефектом гидроксилирования прогестерона, проявляющимся только у гомозигот. Интересным фактом является резкое увеличение продукции андрогенов и меньшее — 17-ОН стероидов у гетерозигот (родителей больных с этим синдромом) после введения им АКТГ.

4. Ингибиторы гидроксилирования прогестерона. В последние годы обнаружены субстанции, тормозящие процесс гидроксилирования прогестерона (24, 25, 26, 27, 30). К ним относится амфенон В (3,5-ди-п-аминофенило)-2-бутанон, а также субстанция, называемая сокращенно SU 4885 (2-метил-1,2-ди(3-пиридило)-1-пропанон) (16, 23, 25).

Амфенон тормозит биосинтез кортикостерона, кортизола и гидрокортизона. Высокая токсичность этого соединения послужила причиной изъятия его из лечебной сети.

SU 4885 является специфическим ингибитором 11-гидроксилирования прогестерона. В результате действия этих субстанций становится невозможной продукция кортизола и гидрокортизона, то есть естественных ингибиторов передней доли гипофиза, продуцирующей АКТГ. Отсутствие ингибитора усиливает выделение АКТГ, что в свою очередь усиливает продукцию субстанции S. Reichsteina, лишенной тормозящего действия на гипофиз. Тест с SU 4885 используется для исследования секреторной функции гипофиза. Больному с подозрением на функциональную недостаточность передней доли гипофиза, после определения у него исходной величины выделения 17-ОН стероидов, дают SU 4885, наблюдая за выделением этих стероидов в течение следующих двух дней. В физиологических условиях SU 4885, тормозя продукцию кортизола, лишает гипофиз естественного тормоза и вторично увеличивает продукцию АКТГ. Этот в свою очередь побуждает надпочечники к большей продукции гликокортикоидов, что, однако, является безрезультатным, ввиду заторможенного 11-гидроксилирования.

Усиленная продукция АКТГ приводит к увеличению продукции не кортизола, а 11-дезоксикортизола, то есть субстанции S. Reichsteina. Ввиду того, что эта субстанция при определении 17-ОН стероидов ведет себя, как кортизол, определяя выделение кортикоидов после введения SU 4885, косвенно определяют также величину выделения АКТГ. Таким образом можно оценить выделительную функцию передней доли гипофиза. У больных с синдромом Sheehana не отмечается увеличения выделения 17-ОН стероидов после введения SU 4885.

Субстанция SU 4885 нашла также применение при проведении „фармакологической адреналэктомии“ у больных с гиперфункцией коры надпочечников (17). Введение этого лекарства лишает организм физиологически активных 17-ОН стероидов, то есть как гликокортикоидов, так и минералокортикоидов. Известно, что как кортизол, так и альдостерон являются 11-гидроксистероидами. Отсюда и целесообразность применения этого препарата в случаях избыточного количества как кортизола (синдромы Кушинга, при которых по разным причинам невозможно произвести хирургической операции), так и альдостерона (особенно случаи вторичного гиперальдостеронизма). Из приведенной схемы биосинтеза следует, однако, что кортикоидом, опережающим альдостерон в процессе его синтеза, является ДОК, количество которого заметно увеличивается после введения SU 4885. Увеличение количества ДОК является результатом увеличения количества АКТГ. Для ликвидации нежелательных симптомов избыточного количества ДОК, возникшего во время применения SU 4885, следует притормозить выделение АКТГ, давая больному небольшие дозы преднизона (5—10 мг). Таким образом получают выпадение продукции биологически активных 11-гидроксистероидов. Поэтому и говорят о фармакологической адреналэктомии.

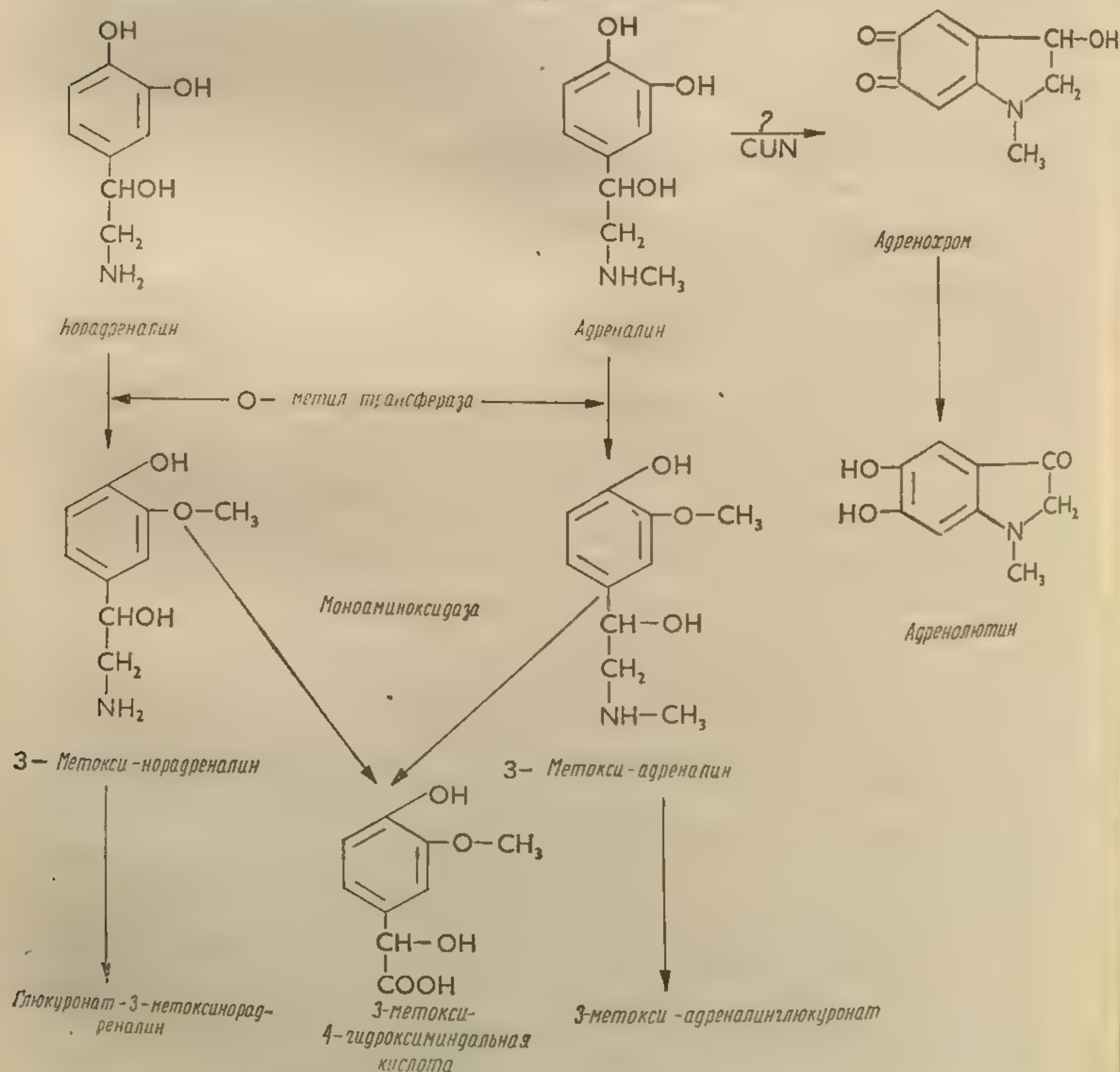


Рис. 70. Катаболизм адреналина и норадреналина.

МОЗГОВОЕ ВЕЩЕСТВО НАДПОЧЕЧНИКОВ

Биогенез адреналина и норадреналина, как и катаболизм этих гормонов, представлен на схеме. Главный путь биосинтеза перечисленных катехоламинов начинается от гидроксилирования тирозина с образованием ди-гидрокси-фенилаланина (ДОФА). ДОФА подвергается декарбоксилированию до гидрокситирамина, а этот в свою очередь, после гидроксилирования боковой цепи, превращается в норадреналин. Метилирование аминной группы норадреналина в конечном счете дает адреналин.

Катаболизм адреналина и норадреналина начинается от метилирования гидроксильной группы при C_3 с образованием 3-метоксинорадреналина и 3-метоксиадреналина. Этот процесс происходит в присутствии о-метил-трансферазы. Продукты метилирования адреналина и норадреналина, подвергаясь действию моноамин-оксидазы, преобразуются в 3-метокси-4-гидроксиминдальную кислоту (МГМ) и в этом виде выделяются с мочой. Около 50—60% образовавшихся в организме аминокатехолов удаляется с мочой в виде МГМ (0,5—8 мг/24 часа). Метилированный адреналин или норадреналин

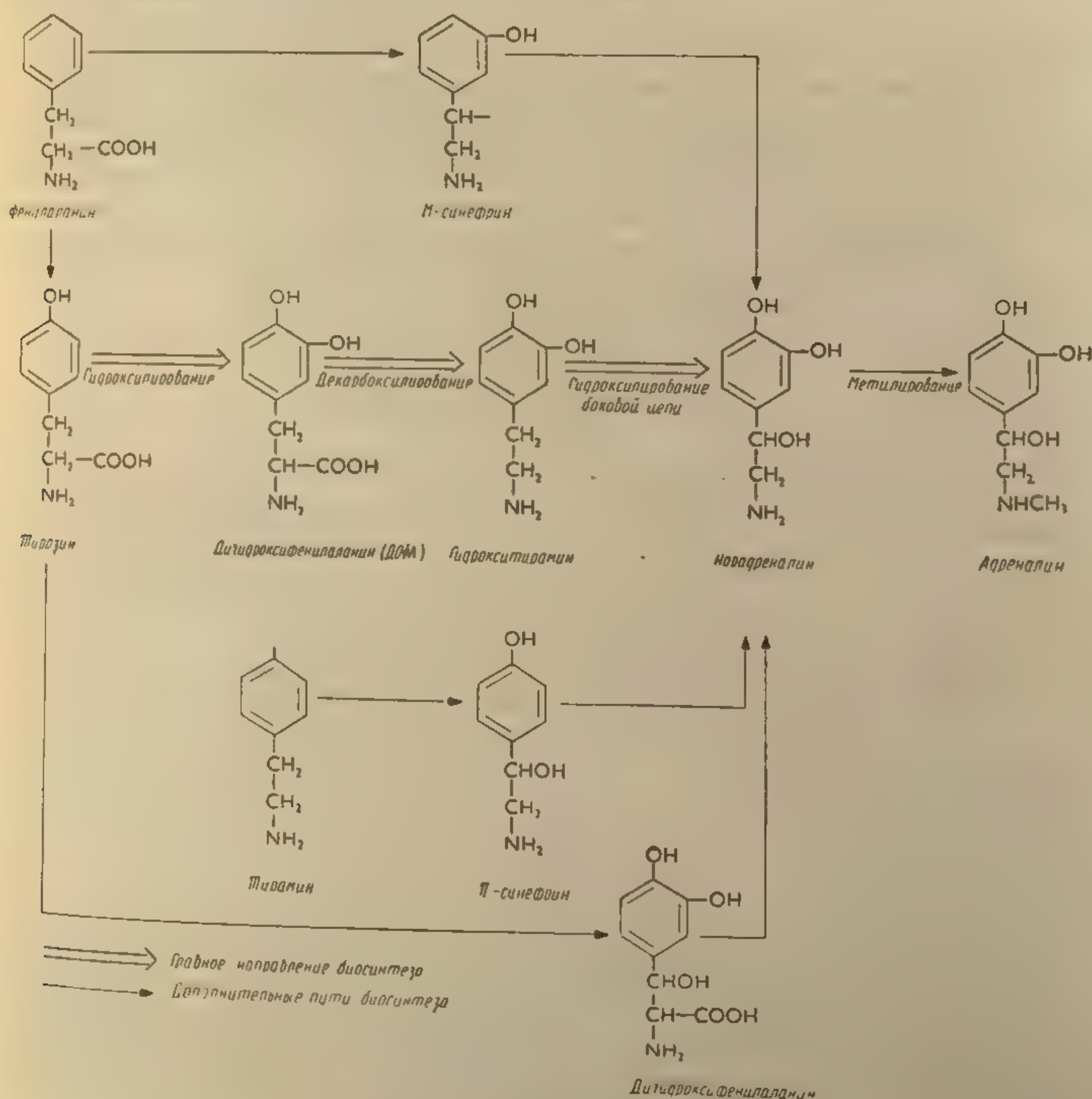


Рис. 71. Биосинтез адреналина и норадреналина.

может, однако, подвергнуться этерификации с глюкуроновой кислотой без предварительного окислительного дезаминирования, и в этом виде выделиться с мочой. Выделяемые с мочой метоксид-адреналин и метоксид-норадреналин-глюкуронаты составляют 20—40% общего количества гормонов, продуцируемых в организме.

Кроме о-метилирования, окислительного дезаминирования и этерификации с глюкуроновой и серной кислотой, существует еще возможность окисления адреналина до адренохрома при участии цитохром-оксидазы или ДОФА-оксидазы (14). Только незначительный процент (3—6%) образовавшегося адреналина и норадреналина выделяется с мочой в неизменном виде (около 50—80 μ г/24 часа) (33).

Понимание путей катаболизма адреналина и норадреналина имеет большое практическое значение. В хромофильных опухолях и в нейробластомах метаболизм этих гормонов может быть расстроен. Хотя чаще всего главным метаболитом в этих случаях является МГМ кислота (18, 21, 32), однако известны случаи, когда выделение этой кислоты было нормальным, а усиленным было только выделение норадреналина (36). Известна также обратная возможность. Поэтому в подозрительных случаях хромофильных опухолей необходимо определять как свободные аминокатехолы, так и их метаболиты.

Роль перечисленных выше гормонов в регуляции кровяного давления, в углеводном обмене а также в качестве медиаторов периферической симпатической системы известна давно. Менее изучено значение адреналина и норадреналина в центральной нервной системе. При нарушении катаболизма адреналина в ЦНС некоторые ученые усматривают причины различных психических болезней. За проявление этих последних должен был бы быть ответственным адренохром, являющийся галлюциногеном.

Об ингибиторах аминоксидазы — смотри лечение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams E., Mc Fadden E. M., Smith E. L.: J. Biol. Chem., 1952, 198, 663. — 2. Ammon R., Dirscherl W.: Fermente-Hormone-Vitamine, Band II. G. Thieme Verlag, Stuttgart; 1960, 470. — 3. Bongiovanni A. M.: J. Clin. Investig., 1958, 37, 1342. — 4. Bongiovanni A. M., Eberlein W. R.: Pediatrics.; 1958, 21, 667. — 5. Dmowski G.: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 325. — 6. Eberlein W. R., Bongiovanni A. M.: Helv. paediat. acta, 1956, 111, 105. — 7. Eberlein W. R., Bongiovanni A. M.: J. Clin. Investig., 1958, 37, 889. — 8. Eberlein W. R., Bongiovanni A. M.: Metabolism 1960, 9, 326. — 9. Fritz J. B.: Am. J. Gastroenterol., 1956, 26, 459. — 10. Gabilove J. L.: Acta Endocrinol., 1961, 36, 281. — 11. Glenn E. M., Bowman B. J., Bayer R. B., Meyer C. E.: Endocrinology, 1961, 68, 386. — 12. Gray C. I., Ramsay C. H., Reifstein R. W.: Am. J. Gastroenterol., 1956, 25, 532. — 13. Green O. C., Migeon C. J., Wilkins L.: J. Clin. Endocrin., Metab., 1960, 20, 929. — 14. Gryglewski R.: Postępy Hig. i Med. Dośw. 1960, 14, 337. — 15. Hechter O., Pincus G.: Physiol. Rev., 1954, 34, 459. — 16. Heftmann E., Mosettig E.: Biochemistry of steroids, Reinhold Publishing Corporation, New York, 1960. — 17. Holub D. A., Jailer J. W.: Ann. Int. Med., 1960, 53, 425. — 18. Jacobs S. L., Sobel C., Henry R. J.: J. Clin. Endocrin., Metab., 1961, 21, 315. — 19. Jones I. Ch.: The adrenal cortex, Cambridge University Press, 1957. — 20. Юдаев Н. А.: Вопросы медицинской химии 1960, 6, 559. — 21. Käser H.: Schweiz. Med. Woch., 1961, 91, 586. — 22. Kędra M., Markiewicz M.: Pol. Arch. Med. Wewn., 1960, 30, 808. — 23. Liddle G. W., Island D., Lance E. M., Harris A. P.: J. Clin. Endocrin., 1958, 18, 906. — 24. Mach R. S., Muller A. F.: Schweiz. Med. Woch., 1957, 87, 406. — 25. Nabarro J. D. N.: Brit. Med. J., 1960, II, 553. — 26. Nichols J., Henninger G.: Endocrinology; 1957, 61, 226. — 27. Peterson R. E., Hertz R., Lubs H. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 94, 421. — 28. Pincus G.: Ann. N. Y. Acad. Scienc., 1955, 61, 283. — 29. Prader A., Spahr A., Neher R.: Schweiz. Med. Wschr., 1955, 85, 1085. — 30. Renold A. E., Crabbe J., Rosa E. J., Hernando-Avendando L., Nelson D. H., Thorn G. W.: J. Clin. Investig., 1956, 35, 731.

31. Schwartz T. B., Engel F. L.: J. Biol. Chemist., 1949, 180, 1047. — 32. Von Studnitz W.: Scand. J. Clin. Lab. Investig, 1960, 12, Supp. 48. — 33. Sunderman F. W., Cleveland P. D., Lago N. C.: Am. J. Clin. Path. 1960, 34, 293. — 34. Thompson R. H. S., King E. J.: J. A. Churchill LTD, London 1959, 242, 280. — 35. Valk W. L., Owens R. H.: J. Urol. 1954, 71, 219. — 36. Voorhess M. L., Gardner L. I.: J. Clin. Endocrinol., Metab., 1961, 21, 321.

ПРЕДСТАТЕЛЬНАЯ ЖЕЛЕЗА

Предстательная железа является органом трубчато-пузырчатого строения, выделяющим простатический сок. Этот последний входит в состав человеческой спермы. Простатический сок имеет характер серозного отделяемого, содержащего большое количество кислой фосфатазы. Согласно Абдергальдену (1) 1 мл спермы содержит около 1500—4000 единиц Bodansky этого фермента. Секреция этого фермента регулируется андрогенами. Введение андрогенов резко увеличивает содержание кислой фосфатазы в предстательной железе, а гипофизэктомия и кастрация приводят к обратному эффекту. Имеется почти полная корреляция между количеством содержащейся в сперме кислой фосфатазы и количеством выделяемых с мочой андрогенов. Эстрогены резко тормозят продукцию предстательной железой этого фермента.

Высокое содержание кислой фосфатазы в простатическом соке использовано в судебной медицине для идентификации пятен, состоящих из засохшей спермы.

В клинической ферментологии имеет большое значение определение кислой фосфатазы в сыворотке крови. В физиологических условиях активность ее в сыворотке незначительна. Имеющаяся в сыворотке кислая фосфатаза вероятно происходит из печени, почек, кишечника, поджелудочной железы и селезенки. Оказалось, что кислая фосфатаза, содержащаяся в желчи, почках, эритроцитах и предстательной железе, отличается от кислой фосфатазы, содержащейся в надпочечниках, тонком кишечнике, печени, поджелудочной железе, селезенке и щитовидной железе тем, что активность первой тормозится алкоголем, а второй остается без изменений (2). Одновременно установлено (2), что муравьиный альдегид является ингибитором фосфатазы эритроцитов, не влияя на активность фосфатазы простатического происхождения. Fishman и сотрудники (4, 5) установили, что кислая „предстательная“ фосфатаза совершенно инактивируется винной кислотой. Таким образом селективное торможение кислой фосфатазы винной кислотой и отсутствие торможения ее муравьиным альдегидом, стало основанием для определения источника кислой гиперфосфатаземии. В дифференциальной диагностике самое большое значение имеет определение этого фермента при новообразованиях предстательной железы, органа, наиболее богатого этими ферментами. При сохранившейся оболочке, рак предстательной железы дает рост активности кислой фосфатазы лишь примерно в 5% случаев. При разрыве оболочки, но без метастазов в кости, процент больных с усиленной активностью кислой фосфатазы в крови увеличивается до 20% (9). При метастазах опухоли предстательной железы в кости патологически усиленная активность фермента встречается в 50—90% случаев (3, 6, 9). Кастрация и введение эстрогенов снижает активность этого фермента в крови. Таким образом наблюдение за активностью этого фермента в перюде лечения имеет большое прогностическое значение. При метастазах рака предстательной железы в кости одновременно увеличивается активность щелочной фосфатазы в крови, которая уменьшается после нескольких дней введения эстрогенов (в отличие от кислой фосфатазы, активность которой падает быстрее, 8).

В некоторых случаях рака предстательной железы с метастазами в кости отмечаются симптомы геморрагического диатеза, которые являются результатом или тромбоцитопении, или наличия простатического фибринолизина, разлагающего фибриноген (10). Во время лечения эстрогенами наблюдается падение активности фибринолизина, параллельное падению активности кислой фосфатазы. При доброкачественной гипертрофии (аденоме) и воспалении предстательной железы, не отмечается кислой гиперфосфатаземии. Также раковые метастазы из других органов в предстательную железу не изменяют активности этого фермента в крови (1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Abderhalden R.: Klinische Enzymologie, G. Thieme Verlag. Stuttgart, 1958, 78. — 2. Abul-Fadl M. A. M., King E. J.: J. Clin. Path., 1948, 1, 80. — 3. Fishman W. N., Bonner C. D., Homburger F.: N. Eng. J. Med., 1956, 255, 925. — 4. Fishman W. H., Dart R. M., Bonner C. D., Ledbetter W. F., Lerner F., Homburger F.: J. Clin. Invest., 1953, 32, 1034. — 5. Fishman W. H., Doubilet H.: J. A. M. A. 1955, 157, 908. — 6. Herbert F. K.: Quart. J. Med., 1946, 15, 221. — 7. Kaye S.: J. Laborat. Clin. Med., 1949, 34, 728. — 8. Langeman H.: Schw. Med. Woch., 1949, 79, 138. — 9. Nesbit R. M., Baum W. C.: J. A. M. A., 1951, 145, 1321. — 10. Tagnon H. J., Schulman P., Whitmore W. F., Leone L. A.: Amer. J. Med., 1953, 15, 875. — 11. Woodard H. O.: Cancer 1952, 5, 236.

ЗАБОЛЕВАНИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

SEWERYN LUKASIK

РАСПРОСТРАНЕНИЕ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ, ЕЕ СОСТАВ И ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ

Соединительная ткань, как ткань самостоятельная, или как одна из составных частей других тканей, имеется почти во всех органах организма. Прежде всего следует здесь назвать: сухожилия, связки, хрящи, фасции, оссеи кости, а кроме того подкожную клетчатку, почечные лоханки, мочеточники, сердечные клапаны, стенки кровеносных сосудов и межклеточную субстанцию (*interstitium*) паренхиматозных органов и мышц.

В общих чертах соединительную ткань можно определить как сетку коллагеновых волокон, ретикулина и эластина в основной бесклеточной субстанции, состоящей главным образом из полисахаридов. В этой структуре имеется, кроме того, различное количество морфологических элементов в виде клеток соединительной ткани, носящих разные названия в зависимости от локализации.

Как вытекает из этого определения, в соединительной ткани можно выделить 3 основные составные части: волокна (нерастворимые), бесструктурную субстанцию (растворимую) и клетки.

Волокна, от которых в основном зависит опорно-механическая функция соединительной ткани, состоят из белковых нитей — прежде всего коллагена, в меньшей степени эластина и ретикулина. В белой соединительной ткани преобладает коллаген, в желтой — эластин (например, в стенках кровеносных сосудов, некоторых связках). Ретикулин имеется главным образом в паренхиматозных органах.

Коллаген является белковым веществом, которого в организме имеется больше всего (около 1/3 всех белков). Цепь этого белка состоит из большого количества глицина и пролина. Эластин составом аминокислот несколько отличается от коллагена. Своеобразие строения ретикулина некоторые авторы

берут под сомнение. Они его считают разновидностью коллагена, только иначе окрашивающейся в гистологических препаратах. Предшественник коллагена выделяется фибробластами в виде проколлагена, который внутриклеточно преобразуется в истинный коллаген. Коллаген разлагается ферментами, встречающимися в некоторых микробах, так называемой коллагеназой (кlostридиопептидаза А), причем чувствительность коллагена разных людей к действию этого фермента различна. До сих пор неизвестно, имеет ли это явление какое-нибудь значение для человеческой патологии. Специфическим ферментом, разлагающим эластин, является эластаза (панкреатопептидаза Э), имеющаяся в поджелудочной железе. Ввиду того, что эластин является важной составной частью артериальных стенок, панкреатопептидазе Э приписывается определенная роль в патогенезе артериосклероза (1, 2).

Бесструктурная клеточная субстанция соединительной ткани состоит главным образом из мукополисахаридов и мукопротеинов. Кроме того она содержит небольшое количество белков плазмы и электролитов. Состав мукопротеинов изучен мало. К мукополисахаридам, находящимся в соединительной ткани, относятся несulfонированные полисахариды: серный хондроитин, мукоитин и в небольших количествах гепарин. Ферментом, деполимеризирующим и гидролизующим мукополисахариды, является гиалуронидаза (гиалуронат-лиаза). Предполагается, что в соединительной клетчатке имеется система: гиалуроновая кислота — гиалуронат-лиаза, имеющая большое значение для биологической функции этой ткани (6).

Клеточные элементы соединительной ткани — это прежде всего фибробласты и их аналоги: в хрящевой ткани — хондробласты и в кости — остеобласты. В меньшем количестве имеются тучные клетки и макрофаги.

МИКРОСТРУКТУРА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Исследования последних лет микроструктуры соединительной ткани в электронном микроскопе показали, что наименьшая единица „тропоколлагена“ имеет размеры примерно $14 \times 2900 \text{ \AA}$ (4). Собственно волокно коллагена состоит из этих основных элементов, соединенных склеивающей субстанцией из мукополисахаридов. Диаметр их равен от 200 до 1000 \AA , а длина от нескольких до двадцати микрон. Эти волокна в электронном микроскопе обладают характерной исчерченностью. Скопления этих волокон соединяются в толстые пучки диаметром примерно в 1μ , а те в свою очередь могут образовать (например, в сухожилиях) пучки, видимые под лупой или не вооруженным глазом. Склеивающая субстанция, соединяющая эти пучки, несколько отличается по своему составу в зависимости от локализации. На периферии такого пучка преобладает гиалуроновая кислота и хондроитин, а внутри — мукополисахариды, содержащие большое количество галактозы, маннозы и глюкозамина.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Физиологическая роль соединительной ткани до настоящего времени точно не изучена, тем не менее как к анахронизму в настоящее время относятся к взгляду, согласно которому соединительной ткани приписывали исключительно опорную функцию, связывания отдельных частей скелета и мышц, а также функцию заполнения пустых мест в структуре паренхиматозных органов. Несмотря на то, что механическая функция, которую выполняет соединительная ткань, несомненно играет для организма важную роль, иссле-

дования последних лет свидетельствуют о том, что не менее важной является другая биологическая задача соединительной ткани — задача поддержания гуморального равновесия тканей. Как известно, между капиллярами и паренхиматозными клетками отдельных органов не существует непосредственной связи. Оба эти биологические пространства отделены друг от друга соединительно-тканной структурой, в состав которой входят базальный слой капилляров и рыхлая сеть коллагеновых волокон, спаянных основной субстанцией, состоящей из полисахаридов. Все вещества, проникающие в паренхиматозные клетки и удаляемые ими в кровеносное русло, должны быть перенесены путем диффузии этим соединительнотканым транспортом. С этой точки зрения соединительная ткань является своего рода регулятором гуморального гомеостаза организма. В определенных условиях эта регуляторная функция соединительной ткани может оказаться расстроенной, что приводит к накоплению в ней электролитов и воды, возникают отеки. Составной частью соединительной ткани, наиболее активной с точки зрения гуморальной регуляции, являются мукополисахариды. Их состав, количество и степень полимеризации имеют решающее значение в характеристике основной субстанции, ее стойкости, проницаемости, способности связывать воду, ионы и так далее. Поэтому метаболизм мукополисахаридов, исследованный при помощи радиоактивных изотопов, оказался более высоким, чем метаболизм коллагеновых волокон.

Биологическая функция мукополисахаридов в свою очередь регулируется гиалуронат-лиазой организма, которая увеличивает проницаемость капилляров и тканей и проницаемость клеточных оболочек, а также ингибиторами этого фермента, которые в физиологических условиях имеются в крови, и к которым относятся также гормоны коры надпочечников. Эти вопросы еще недостаточно изучены, и до настоящего времени существование системы мукополисахариды—гиалуронатлиаза, от которой зависит гуморальное равновесие тканей, является гипотезой.

ПАТОЛОГИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ (КОЛЛАГЕНОЗЫ, РЕВМАТИЗМ)

Проблема системы мукополисахариды—гиалуронат-лиаза тесно связана с выделением в патологии человека группы заболеваний, называемых „коллагенозы“ (8). Под этим термином не следует понимать заболеваний с общей или родственной этиологией, а лишь заболевания, при которых патологические процессы являются системными и разыгрываются в соединительной ткани. При этом термин „коллагенозы“, хотя и является общепринятым, не отображает истинного положения вещей, так как при этих заболеваниях биохимические расстройства в соединительной ткани меньше касаются самого коллагена, метаболически мало активного, а скорее межклеточной субстанции, то есть мукополисахаридов, характеризующихся большим метаболическим динамизмом. Патологический процесс до некоторой степени поражает также и клеточную часть ткани, то есть фибробласты.

Изменения этого вида особенно резко выражены при некоторых ревматических заболеваниях, когда вся соединительная ткань подвергается пролиферации, а в области межклеточной субстанции, состоящей из мукополисахаридов, отмечается деполимеризация или неполная полимеризация молекул. Сходный деградиционный процесс касается гиалуроновой кислоты в синовиальной жидкости суставов, от которой зависит вязкость этой жидкости. Синовиальная жидкость, в которой гиалуроновая кислота подвергалась деполимеризации, совершенно теряет свои физические свойства, благодаря

которым трение суставных поверхностей в физиологических условиях сведено до минимума.

Как известно, АКТГ, стероиды коры надпочечников и салицилаты влияют нормализующим образом на эти патологические процессы.

До настоящего времени окончательно не выяснено, зависит ли это терапевтическое действие перечисленных препаратов также от их влияния на систему мукополисахариды—гиалуронат-лиаза (ингибирующее действие по отношению к гиалуронат-лиазе).

ГИАЛУРОНАТ-ЛИАЗА

Действие гиалуронат-лиазы, в качестве так называемого фактора распространения („*spreading factor*“), впервые обнаружил Duran-Reynals в 1928 г (7). Он установил, что при применении экстрактов из яичек, инфекционные процессы распространяются быстрее. Позже оказалось, что такими же свойствами обладают некоторые экстракты из бактерий, яды змей, насекомых, а до некоторой степени также экстракты из других органов животных, кроме яичек: из желудочной стенки, кишечника, поджелудочной железы и селезенки. Дальнейшие многочисленные работы в этой области показали, что этим фактором распространения является фермент или комплекс ферментов, в настоящее время называемый гиалуронат-лиазой (6). Гиалуронат-лиаза вызывает деполимеризацию и гидролиз гиалуровой кислоты путем расщепления глюкозамидных связей. Деполимеризующее действие гиалуронат-лиазы относится не только к гиалуровой кислоте, но и к остальным мукополисахаридам, имеющимся в межклеточной субстанции соединительной ткани. В результате этого под влиянием гиалуронат-лиазы резко увеличивается проницаемость тканей и клеточных оболочек, что имеет огромное значение в патологии бактериальных и вирусных инфекций, а также при отравлении ядами змей и насекомых. Установлено, что вирулентность стрептококков, вызывающих рожу, в большой степени зависит от активности вырабатываемой ими гиалуронат-лиазы. То же самое относится к микробам газовой гангрены. Не исключено, что и в патогенезе острой ревматической болезни определенную роль играет гиалуронат-лиаза, вырабатываемая атакующими организм стрептококками. То же самое можно отнести к явлениям очаговой инфекции.

Терапевтическое действие некоторых препаратов (например, противревматических средств) до некоторой степени связано с торможением ими активность гиалуронат-лиазы. К ингибиторам гиалуронат-лиазы относятся: стероиды коры надпочечников, салицилаты, ацетиловые и азотные производные гиалуроновой кислоты, гепарин, желчные кислоты и так далее. Ингибитор гиалуронат-лиазы имеется также в нормальной плазме.

К группе ферментов, расщепляющих мукополисахариды, кроме гиалуронат-лиазы относится также мурамидаза, а в некотором смысле и гепариназа.

Определение активности гиалуронат-лиазы не нашло применения в ферментологической диагностике, но в терапии широко применяются препараты, богатые этим ферментом (3, 5, 9).

РАССТРОЙСТВА РАЗВИТИЯ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Кроме перечисленных выше приобретенных заболеваний, в патогенезе которых нарушения метаболизма соединительной ткани играют важную, или даже решающую роль, существуют редкие формы патологических синдро-

мов, при которых основные изменения также локализируются в соединительной ткани. Считается, что в основе этих заболеваний лежат ферментные дефекты, обусловленные генетически.

Синдром Marfan. Основными симптомами этого синдрома являются: долихостеномелия, то есть длинные и тонкие конечности со слишком свободным связочным аппаратом (разболтанные суставы), вывих хрусталика и расширения аорты. В гистологической картине аорты отмечается дистрофия эластических элементов. Предполагается, что в основе этих изменений лежит генетическое расстройство метаболизма эластических волокон соединительной ткани аорты и аппарата движения, в результате какого-то ферментного дефекта.

Синдром Ehlers и Danlos. Основным симптомом этого синдрома является чрезмерная эластичность и ломкость кожи и разболтанность суставов. Как дополнительное осложнение может иметь место расслаивающаяся аневризма аорты. Считается, что в основе этих изменений лежит дефект в образовании пучков коллагеновых волокон. Вместо линейной структуры волокнистых элементов соединительной ткани, в этих случаях коллагеновые волокна образуют беспорядочную сеть.

Osteogenesis imperfecta. При этом синдроме патологические изменения касаются не только соединительнотканной основы кости, но и всей соединительной ткани организма. Основными симптомами этого заболевания являются: ломкость костей, глухота, тонкая кожа, расслабление связочного аппарата, голубые белки, грыжи. В основе этих изменений скорее всего лежат расстройства созревания (синтеза) коллагеновых волокон и ретикулина.

Pseudoxanthoma elasticum. Симптомы: *cutis rhomboidea nuchae* (утолщенная, сморщенная, шероховатая кожа), иногда симптомы геморрагического диатеза (дегенерация стенок мелких артериальных сосудов). Причиной вероятно являются врожденные расстройства синтеза коллагена.

Синдром Hurlera. Симптомы: деформация скелета, ограничение подвижности суставов, грыжи, увеличение печени и селезенки, глухота, умственное недоразвитие. Причиной является наследственное расстройство метаболизма мукополисахаридов в межклеточной субстанции соединительной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Balo J., Banga J.: Nature; 1949, 164, 491. — 2. Banga J., Balo J.: Nature; 1953, 171, 44. — 3. Batycki W., Pasławska J., Rogalski E.: Gruźlica; 1956, 24, 99. — 4. Boetker H., Doty P.: J. Am. Chem. Soc. 1955, 77, 248. — 5. Bross W., Garbiński T., Nowalany J.: Prace Wrocławskiego Towarzystwa Nauk., Wrocław 1957. — 6. Chain E., Duthie E. S.: Brit. J. Exper. Path., 1940, 21, 324. — 7. Duran-Reynals F.: Compt. Rend. Soc., de Biol. 1928, 99, 6. — 8. Klemperer P., Pollak A. D., Bachr.: New York State J. Med. 1942, 42, 2225. — 9. Morawska Z.: Ped. Pol., 1955, 30, 833.

ЗАБОЛЕВАНИЯ КОСТЕЙ

SEWERYN ŁUKASIK

СОСТАВ, ХИМИЧЕСКОЕ СТРОЕНИЕ И МИКРОСТРУКТУРА КОСТЕЙ

Химический состав костей, как и их микро-и макроскопическое строение уже давно изучены довольно точно, но исследование метаболизма костной ткани (особенно относительно процесса окостенения) находятся в начальной стадии.

Как известно, костная ткань состоит из органических частей, составом и микроструктурой соответствующих соединительной ткани, и из выкристаллизованных минеральных солей. Органическая часть кости образует каркас („matrix“ англосакских авторов), на котором вторично осаждаются минеральные соли. Хрящ отличается от кости в основном лишь отсутствием неорганических составных частей.

Неорганическая часть кости образует пространственную структуру гидроксиапатита, расположенную вдоль коллагеновых волокон. Гидроксиапатит состоит из ионов кальция, фосфата и гидроксильных ионов с химической формулой $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ или $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$, причем наименьшая кристаллографическая единица состоит из 18 разных молекул (9). В состав кристаллов кости входит также небольшое количество ионов карбонатов и фторидов. Наименьшая структурная единица кости, видимая в электронном микроскопе, имеет размеры 50×500 до 1000 \AA . Поверхность кристаллов в 1 г кости равна примерно 100 м^2 , что обеспечивает костной ткани, вопреки тому, что о ней судили раньше, большую метаболическую активность.

БИОХИМИЯ ОКОСТЕНЕНИЯ

Биохимия окостенения, то есть метаболические процессы, обуславливающие минерализацию соединительной ткани, составляющей каркас кости, до настоящего времени изучена недостаточно. Еще окончательно не установлено, почему в одном и том же организме хрящ в одном месте окостеневает, а в другом — нет.

Наиболее распространенной в литературе теорией окостенения является гипотеза, предложенная в 1923 г. Robinson (11). Этот автор основную роль в процессе минерализации кости приписывал щелочной фосфатазе. Он установил, что некальцифицированные срезы кости в среде фосфатных эфиров глюкозы вызывают ферментативное разложение этих эфиров с одновременным образованием осадка фосфата кальция в зоне роста. Отсюда появилась гипотеза, что в процессе окостенения *in vivo* решающее значение имеет активность щелочной фосфатазы, продуцируемой остеобластами и выделяемой в межклеточное пространство. Этот фермент вызывает гидролиз органических фосфатных эфиров, диффундирующих из крови в соединительную ткань, в результате чего увеличивается локальная концентрация ионов PO_4 вплоть до превышения определенной постоянной величины, выше которой происходит осаждение соли $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Часть фосфатазы проникает в кровяное русло и поэтому в сыворотке как правило удается отметить активность этого фермента. Подтверждением этой гипотезы явилось установление гистохимическими методами того факта, что молодой, окостеневающий хрящ обладает гораздо более высокой активностью щелочной фосфатазы, чем кость взрослых животных.

Однако гипотеза Robinson не объясняла всех фактов. Между прочим оказалось, что при рахите имеется нормальная или увеличенная активность щелочной фосфатазы, несмотря на резкое расстройство процессов окостенения. Поэтому Robinson принял существование „второго механизма“ процесса минерализации кости, от которого зависят биохимические изменения не гуморальной, а местной, тканевой природы.

Исследования последних лет заставили усомниться в правильности гипотезы Robinsona. Как оказалось (9), локальное увеличение концентрации ионов PO_4 , необходимое для осаждения фосфатных солей кальция, должно быть значительным, гораздо более высоким, чем то, которое обеспечивает коли-

чество фосфатных эфиров глюкозы, имеющих в каркасе соединительной ткани кости. Кроме того установлено, что иногда происходит обывествление соединительной ткани, в которой вообще отсутствует щелочная фосфатаза. Поэтому возникла новая теория окостенения, так называемая нуклеационная теория (9). Она основана на наблюдении, что коллаген вызывает специфическое образование кристаллических ядер (агрегатов) из растворов фосфата кальция. Такие агрегаты, раз возникнув, спонтанно увеличиваются ввиду плохой растворимости соли. Активными группами коллагена являются свободные ϵ -аминные группы. Группы эти в коллагене, не вызывающем нуклеации, связаны, и это, возможно, объясняет различие в способности к минерализации соединительной ткани в разных местах одного и того же организма. Явление нуклеации очень чувствительно к локальному pH среды. Увеличение щелочности среды резко ускоряет процесс. В этом важную роль могут играть дезаминирующие ферменты остеобластов, имеющиеся в этих клетках в большом количестве (7). Эти ферменты продуцируют аммиак. Сильными ингибиторами нуклеации являются фосфатные эфиры. Роль щелочной фосфатазы заключалась бы в удалении этих ингибиторов из данной среды. Еще неизученную, но вероятно важную роль в процессе окостенения, играют мукополисахариды, имеющиеся в межклеточной субстанции соединительной ткани.

Суммарно, согласно этой теории (9) в процессе окостенения принимают участие следующие явления: 1) ферментативная продукция особым коллагеном специфической кристаллографической формы в виде агрегатов фосфатных солей кальция (явление нуклеации); 2) внеклеточная активность щелочной фосфатазы, необходимая для удаления ингибиторов этого процесса (фосфатных эфиров); 3) ферментативное локальное ощелачивание данной среды вероятно путем продукции аммиака и 4) комплекс клеточных ферментов, регулирующих наличие и состав мукополисахаридов в окостеневающей соединительной ткани.

Ясно, что кроме этих местных процессов, для окостенения необходима достаточная концентрация строительного материала в крови, в виде ионов кальция и фосфатов. Достаточную концентрацию этих веществ в крови обеспечивает функция кишечного эпителия и почечных канальцев. Клетки этих органов получают необходимую им для этой цели энергию из характерного для них высокого кислородного гликолиза. Щелочная фосфатаза имеется в этих тканях в большом количестве, что объясняется их ролью в транспорте фосфатов. Функция кишечника и почек в сохранении соответствующей концентрации фосфатных ионов и кальция в крови зависит в свою очередь от гормонов паращитовидных желез и витамина D.

Явление растворения кости, остеоклазии достаточно не изучено. Вероятно путем увеличения кислотности среды (лимонная, молочная кислота) дело вначале доходит до деминерализации кости, а затем, путем ферментативного разложения коллагена и мукополисахаридов, разрушается ее соединительнотканый каркас.

АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КОСТЕЙ

Согласно гипотезе окостенения Robinson, по которой щелочная фосфатаза играет доминирующую роль в процессе минерализации соединительнотканного каркаса кости, большие надежды возлагались на определение активности этого фермента в сыворотке крови. Ожидалось, что щелочная фосфатаза

сыворотки, которая действительно главным образом происходит из костной ткани, явится ценным диагностическим тестом при патологии костной системы, а также поможет в выяснении неясного патогенеза многих заболеваний этой системы. Отсюда и огромное количество клинических работ о колебаниях активности щелочной фосфатазы при различных заболеваниях. Сегодня можно уже сказать, что значение активности щелочной фосфатазы крови, как диагностического теста при заболеваниях костной системы, невелико, и многие работы в этой области потеряли актуальность.

В норме активность щелочной фосфатазы крови у взрослых равна 1,5—4 единицы Bodansky на 100 мл крови, или 4—13 единиц King-Armstrong. В основном подтверждается принцип, что там, где остеопозитическая активность щелочной фосфатазы крови. Поэтому у детей активность фермента, как правило более высокая, чем у взрослых (1,5 до 3 раз — у разных авторов), а у недоношенных детей более высокая, чем у родившихся в срок. Увеличение активности фермента имеет место также у матери в более позднем периоде беременности.

РАССТРОЙСТВА РАЗВИТИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

При врожденных заболеваниях костной системы колебания активности щелочной фосфатазы крови нехарактерны. Единственным исключением является так называемая гипофосфатазия, заболевание, клинически сходное с рахитом, и характеризующееся низким содержанием или отсутствием щелочной фосфатазы в крови и тканях. В литературе приведены лишь отдельные случаи этого заболевания (5, 10, 12, 14).

РАХИТ

Механизм действия витамина D на процессы окостенения точно не выяснен. Здесь имеет место как влияние его на всасывание кальция в эпителии кишечника и почечных канальцах, так и непосредственное влияние витамина на метаболизм костной ткани. Установлено, что дефицит витамина D вызывает расстройства в цикле Кребса (15).

Несмотря на расстройство процесса окостенения при рахите, многочисленные клинические исследования показали нормальную или увеличенную активность щелочной фосфатазы в крови при этом заболевании. Разные авторы указывают на рост активности фермента в 65—90% случаев рахита (2, 4, 8). Встречается увеличение активности до 190 единиц Bodansky (3). В случаях с увеличенной активностью фермента лечение витамином D приводит к нормализации его уровня, что некоторые авторы (8, 13) считают наиболее ценной информацией, какую может дать определение активности щелочной фосфатазы в крови при рахите.

В качестве диагностического теста активность щелочной фосфатазы при этом заболевании имеет небольшое значение. Некоторые авторы признают значение этой пробы лишь для диагностики ранних или скрытых форм заболевания (4).

Гистохимические исследования локализации щелочной фосфатазы в рахитической кости не показали отклонений от нормы, что свидетельствует о том, что фермент не играет важной роли в патогенезе данного заболевания.

ОСТЕОМАЛЯЦИЯ

Как и при рахите, большинство случаев остеомалиции (являющейся следствием авитаминоза D у взрослых) также характеризуется увеличением активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови. Лечение витамином D, вместе с клиническим улучшением, приводит и в этих случаях к падению активности фермента, причем клинические симптомы заболевания исчезают быстрее, чем наступает нормализация повышенной активности фосфатазы. Поэтому определение активности щелочной фосфатазы в этих случаях имело бы главным образом значение как показатель эффективности примененного лечения. Кроме того, некоторые авторы подчеркивают значение этого ферментативного теста в диагностике скрытых или ранних форм заболевания, а также в дифференциальном диагнозе остеомалиции и остеопороза, так как при этом последнем заболевании активность фосфатазы в крови не изменяется.

БОЛЕЗНЬ PAGETA (*OSTEITIS DEFORMANS*)

Этиопатогенез этого заболевания окончательно не выяснен. Некоторые считают это редкое заболевание костной формой артериосклероза. В результате распространения артериосклеротического процесса на костные артерии дело доходит до расстройства питания костной ткани, что приводит к ее фиброзу и деформации. Патологический процесс может иметь место как в одной, так и во многих костях, как плоских, так и трубчатых.

Активность щелочной фосфатазы крови при этом заболевании обычно повышена, что объясняется усиленной гиперплазией остеобластов, характерной для данного заболевания. Имеется определенный параллелизм между распространением патологического процесса и величиной активности щелочной фосфатазы (6). При тяжелых формах заболевания отмечается увеличение активности фермента до величин, превышающих 130 единиц.

ГИПЕРФУНКЦИЯ ПАРАЩИТОВИДНЫХ ЖЕЛЕЗ (БОЛЕЗНЬ РЕКЛИНГАУЗЕНА, *OSTEITIS FIBROSA CYSTICA GENERALISATA*)

Механизм действия паратгормона на метаболизм костной ткани до настоящего времени точно не изучен. Одни авторы считают, что точкой приложения действия гормонов являются сами остеобласты, другие — расстройство реабсорбции PO_4 эпителием почечных канальцев, наконец третьи — расстройство выделения ионов кальция. Во всяком случае при этом заболевании дело как правило доходит до отрицательного баланса кальция в организме. В костной ткани появляются очаги декальцинации, причем переведенный в растворимую фазу кальций повышает уровень ионов Ca^{++} в крови.

Активность щелочной фосфатазы крови при этом заболевании обычно увеличивается, причем это увеличение зависит от тяжести заболевания (1).

В почечной форме болезни Реклингаузена не наблюдается отчетливого повышения активности фермента.

Хирургическое лечение гиперфункции паращитовидных желез вместе с клиническим улучшением приводит также к постепенной нормализации активности щелочной фосфатазы крови.

ПЕРВИЧНЫЕ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ КОСТЕЙ

Чаще всего наблюдается саркома (*sarcoma osteogenes*). Различается остеобластический и остеолитический тип саркомы. Увеличение активности щелочной фосфатазы, иногда значительное, имеет место в большинстве случаев остеобластической формы, а в случаях остеолитической саркомы активность фермента в сыворотке крови в большинстве случаев не изменяется.

Определение активности щелочной фосфатазы при остеосаркоме может иметь значение для оценки эффективности хирургического лечения. Новый рост активности фермента, если имелось первоначальное падение его после ампутации конечности, свидетельствует о наличии метастазов опухоли.

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ МЕТАСТАТИЧЕСКИЕ ОПУХОЛИ КОСТЕЙ

Метастазы в кости чаще всего дает рак грудной железы, щитовидной железы, почек, предстательной железы. И здесь различается остеобластическая и остеолитическая форма опухоли, но обе эти формы могут являться фазами развития той же самой опухоли.

Увеличение активности щелочной фосфатазы чаще всего встречается при остеобластической форме метастатического рака кости. Определение активности фермента может помочь в ранней диагностике метастазов в кости обнаруженного рака мягких тканей, и может также иметь значение в оценке эффективности примененного лечения.

При других заболеваниях костей, кроме перечисленных выше, изменения активности щелочной фосфатазы не закономерны. Здесь следует вспомнить лишь о диагностическом значении определения активности кислой фосфатазы крови при раке предстательной железы с метастазами в кости. Увеличение активности кислой фосфатазы в сыворотке крови обнаружено больше, чем в 80% случаев этого заболевания (3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Albright F., Buttler F. A., Bloomberg E.: Amer. J. Dis. Child. 1937, 54, 529. — 2. Barnes D. J., Carpenter M. D.: Pediatr., 1937, 10, 596. — 3. Bodansky A., Jaffe H. L.: Amer. J. Dis. Child., 1934, 48, 1268. — 4. Corner B. D.: Arch. Dis. Child., 1944, 19, 68. — 5. Fraser D., Yendt E. R., Christie F. H. E.: Lancet; 1955 (I), 286. — 6. Hirsch W.: Münch. Mediz. Wschr., 1955, 97, 687. — 7. Lutwak-Mann C.: Biochem. J., 1940, 34, 517. — 8. Morris N., Stevenson M. M., Small J.: Arch. Dis. Childh. 1937, 12, 45. — 9. Neuman W. F.: Enzymic regulations in the bones. Enzyme regulations in clinical medicine. Proceedings of the 6th International Congress of Internal Medicine, Basel 1960. Wyd. A. Gigon i H. Ludwig; 183. — 10. Rathbun J. C.: Amer. J. Dis. Child., 1948, 75, 822. — 11. Robinson R.: Biochem. J. 1923, 17, 286. — 12. Schlesinger B., Ludar J., Bodan M.: Arch. Dis. Childh., 1955, 30, 265. — 13. Smith J.: Arch. Dis. Childh., 1933, 8, 215. — 14. Sobel E. H., Clark L. C., Fox R. P., Robinow M.: Pediatrics 1953, 11, 309. — 15. Tulpule P. G., Patwardhan V. N.: Biochem. J. 1954, 58, 61.

ЗАБОЛЕВАНИЕ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

SEWERYN ŁUKASIK

СОСТАВ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

К основным веществам, входящим в состав мышечной ткани, относятся: белки, гликоген и его производные, креатин и его производные, аденозинтрифосфорная кислота, пуриновые соединения и электролиты примерно такого же состава, как и в межклеточной жидкости.

Различают 2 типа мышечных белков: фибриллярные (миозин, белки стромы) и клубочковые (альбумины, глобулины и другие). Из фибриллярных белков состоят структуральные и сократительные элементы мышцы. Клубочковые белки являются катализаторами биохимических процессов и поставщиками энергии. Сарколемма состоит из эластических волокон соединительной ткани.

При экстракции мышцы холодной водой получают миоген, который состоит главным образом из необходимых для гликолиза ферментов, находящихся в саркоплазме мышечного волокна. Часть этой фракции в кристаллической форме получил Baranowski (2). Экстракция оставшейся части мышечной ткани щелочным хлоридом калия дает миозин. То, что остается после этой экстракции, носит название стромы (*stroma*). В ней имеется белок — актин, который вероятно образует с миозином комплекс, называемый актомиозином.

МИКРОСТРУКТУРА МЫШЕЧНЫХ ВОЛОКОН

Исследование в электронном микроскопе поперечных срезов мышечных волокон (миофибрилл) показали, что элементарные нити (протофибриллы) миозина и актина расположены следующим образом: отдельные нити миозина (диаметром около 100 \AA) окружены 6 нитями актина (диаметром около 50 \AA). Несколько сот нитей обоих видов образует мышечное волокно диаметром примерно 1 \mu . Такое волокно исчерчено светлыми и темными полосами. Функционально актин и миозин ведут себя по-разному. Некоторые авторы предполагают, что их связь в актомиозиновом комплексе является артефактом, зависящим от способа экстракции. Гликоген и ферменты, необходимые для разложения комплекса, находятся в саркоплазме. В ней находится также часть АТФ, миоглобин, ферменты митохондриальной системы и фосфагены.

БИОХИМИЯ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

В 1940 г Engelhardt (7) установил, что нить актомиозина, погруженная в раствор АТФ, сокращается, причем АТФ деградирует до АДФ с освобождением фосфата. Это свидетельствует о том, что АТФ играет роль в качестве поставщика энергии для мышечного сокращения. Этот вывод подтверждается тем, что белок, из которого построено сократительное волокно, одновременно является аденозинтрифосфатазой (АТФ-аза). Ионы кальция активизируют этот процесс.

Несмотря на то, что мышца в покое обладает всеми элементами системы, необходимыми для сокращения, сокращение происходит лишь тогда, когда подействует нервный импульс. Мышечное волокно электрически поляризовано (в покое потенциал достигает 100 mV) и нервный импульс вызывает деполяризацию, которая временно изменяет проницаемость оболочек для электролитов. Это вероятно дает начало ферментным процессам системы актин — миозин — АТФ, причем энергию для мышечной работы доставляет АТФ. Запас АТФ в мышце невелик, и его хватает примерно лишь на 0,5 секунды сокращения, но мышца обладает возможностью быстрой регенерации этого соединения. Здесь важную роль играет фосфокреатин, которого в мышечной ткани в 4—6 раз больше, чем АТФ. Под воздействием креатинкиназы наступает перенос фосфатной группы с фосфокреатина на

АДФ, причем образуется АТФ и креатин. Но и этого энергетического запаса хватило бы только на несколько секунд максимальной работы мышцы.

Достаточное количество энергии доставляет в случае необходимости ферментативное разложение гликогена до молочной кислоты. 1 моль глюкозы, освобожденный из гликогена, делает возможным синтез 3 молей АТФ. В периоде отдыха кислородная задолженность компенсируется: молочная кислота ресинтезируется в печени до гликогена, а часть сгорает до CO_2 — так, что в окончательном итоге всю энергию, необходимую для мышечной работы, доставляет сгорание углеводов.

Натощак и в условиях голодания мышца черпает значительную часть энергии также из окисления жирных кислот до ацетоуксусной кислоты. Кислород, приносимый оксигемоглобином крови, переносится к митохондриям саркоплазмы мышечного волокна миоглобином.

МЕТОДЫ ФЕРМЕНТНЫХ АНАЛИЗОВ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МЫШЦ

Существует два способа проведения ферментных анализов при заболеваниях мышц. Один заключается в определении активности тканевых ферментов, причем материал для анализа получают путем биопсии мышц, другой заключается в определении активности ферментов в сыворотке крови. Тканевые ферментные анализы дают несколько больше данных для расшифровки вопросов физиологии и патологии мышечной ткани, но ввиду их технической трудности производятся только в некоторых учреждениях занимающихся теоретическими проблемами. Исследования такого характера уже в 1951 г. пробовали производить Bien и сотрудники (3) при ревматических заболеваниях. Для развития этой области науки в последнее время особенно много сделали Dreyfus и Schapira (4, 5, 6, 10).

Ферментные анализы сыворотки крови доступны каждой ферментологической лаборатории и поэтому они распространены гораздо шире. Они касаются тех ферментов, которые, как принято считать, происходят из мышечной ткани, а именно: альдозазы, глутамин-щавелевоуксусной трансаминазы (аспарагинат-аминотрансферазы) и глутаминпирувиноградной трансаминазы (аланин-аминотрансферазы), креатинкиназы, глюкозофосфатизомеразы и лактатдегидрогеназы. В клинике наиболее широкое применение нашла альдозаза.

ТКАНЕВЫЕ ФЕРМЕНТЫ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МЫШЦ

С точки зрения патогенеза, заболевания мышц можно разделить на две группы: атрофии и дистрофии (истинные миопатии). Первые заключаются, как известно, в атрофии истинной мышечной ткани в результате бездеятельности, вызванной повреждением аппарата движения, или — нервных двигательных путей. В дистрофиях различают идиопатические семейные миопатии (*dystrophia musculorum progressiva*, *myotonia congenita*, *dystrophia myotonica*) а также миопатии неясного происхождения, как, например, *myasthenia* и *amyotonia congenita*.

Врожденные мышечные дистрофии являются заболеваниями, вероятно обусловленными генетическими дефектами, и таким образом их можно отнести в группу ферментопатий. Редкость этих заболеваний до настоящего времени не позволяет провести исследование активности тканевых ферментов на

большом материале. Отдельные авторы наблюдали группы больных, в большинстве своем не превышающие несколько человек.

АТФ-аза. Как мы уже указывали, АТФ-азной активностью в мышце обладают фибриллы актомиозина. Таким образом они являются и ферментом и субстратом сокращения. Как при атрофиях, так и при истинных миопатиях, количество актомиозина уменьшено, что связано с уменьшением мышечной массы при этих заболеваниях в пользу соединительной ткани. Сокращается также средняя длина волокон.

Гликогенолитические ферменты. Активность альдолазы, фосфорилазы (α -глицон фосфорилазы) и глюкозофосфомутазы при миопатиях отчетливо снижена. Отмечается повышение активности лактатдегидрогеназы. Падение активности гликогенолитических ферментов отмечается также при атрофиях.

Миоглобин. При миопатиях количество его падает резко, при атрофиях — умеренно.

Ферменты митохондриальной системы. Сукцинатдегидрогеназа и сукцинатоксидаза, цитохромоксидаза, фумаратгидратаза и аконитазгидратаза проявляют умеренное падение активности при миопатиях. При этих заболеваниях уменьшается также разница в содержании кислорода в артериальной и венозной крови.

Креатинкиназа. При миопатиях отмечается умеренное падение активности креатинкиназы. Это связано с расстройством метаболизма креатина, заключающимся в нарушении перехода креатина в фосфокреатин и креатинин. Отсюда у этих больных отмечается усиленная идиопатическая креатинурия, которая усиливается после введения предшественника креатина — глицина.

Ферменты белкового метаболизма. Как при миопатиях, так и при атрофиях, отмечается увеличение активности протеазы и дипептидазы, что связано с деструкцией мышечной ткани у этих больных (12).

Выводы. Анализы тканевых ферментов при заболеваниях мышц не обнаружили изменений, специфических для какой-то нозологической формы или группы заболеваний, и поэтому они до сих пор не могут служить для целей диагностики. Эти исследования пока не помогли также и в разрешении вопроса патогенеза этих заболеваний.

ФЕРМЕНТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МЫШЦ

В качестве диагностического теста при заболеваниях мышц наиболее широкое применение из ферментов сыворотки нашла альдолаза. Уже в 1949 г Sibley и сотрудники (11) отметили повышение ее активности при мышечной дистрофии. В последние годы Dreyfus и Schapira (5), а также и другие авторы (1, 8, 9), занимались изучением активности этого фермента на большом материале, а также отношением его ко многим другим ферментам сыворотки. Механизм элиминации ферментов из мышц в сыворотку крови неизвестен.

Причиной роста активности альдолазы и других ферментов в сыворотке крови при миопатиях считается прежде всего сам факт деструкции мышечных волокон, а также фактор гипоксии (худшее использование кислорода). Не исключено влияние гормональных расстройств. Установлено, что введение животным АКТГ и кортизона вызывает рост уровня альдолазы в сыворотке (5). Уже в физиологических условиях альдолаза быстро освобождается из мышц в кровь. После кровопускания и переливания крови исходный уровень фермента достигается уже через 12 часов. При внутривенном введении кристаллической альдолазы кроликам оказалось, что время полураспада этого фермента

в крови равно 10,5 часам (5). При определении артерио-венозной разницы в содержании альдолазы у миопатов установлено, что активность этого фермента в венозной крови является отчетливо более высокой, чем в артериальной, что свидетельствует о мышечном, а не печеночном происхождении фермента. Это подтвердили также электрофоретические анализы сыворотки, мышц и печени.

Dystrophia musculorum progressiva (прогрессивная мышечная дистрофия). Это заболевание характеризуется самым большим и постоянным, по сравнению с другими миопатиями, увеличением активности ферментов сыворотки крови мышечного происхождения. Увеличение активности альдолазы, глюкозофосфатизомеразы, креатиназы, трансаминаз и лактатдегидрогеназы отмечено в 90% случаев (5). Активность альдолазы в среднем была в 9 раз более высокой, аланин-аминотрансферазы в 5,2 раза, лактатдегидрогеназы в 3,8, аспартат-аминотрансферазы в 3,3 раза, а глюкозофосфатизомеразы в 2,4 раза более высокой. Однако наибольший рост отмечен у креатинкиназы. Активность этого фермента у больных была в среднем в 50 раз более высокой, чем у здоровых. Чувствительность указанных ферментных тестов в значительной степени зависит от стадии заболевания и возраста больных. Максимальное повышение активности отмечается в начале заболевания и у детей. У взрослых, особенно в последних стадиях заболевания, активность ферментов часто бывает нормальной.

Из всех перечисленных ферментов наибольшее применение в клинической диагностике прогрессивной мышечной дистрофии, а также и других заболеваний мышц, нашла альдолаза. Основным достоинством ее является хорошо разработанная методика определения и установленные нормы активности. Главным недостатком — неспецифичность. С этой точки зрения ее превосходит креатинкиназа. Активность этого фермента в скелетных мышцах превышает активность его в других тканях в 20 раз, а в мышце сердца в 10 раз. Поэтому рост его активности при миопатии следует дифференцировать только с заболеваниями сердца. Этого фермента нет в эритроцитах, поэтому гемолиз пробы крови не является препятствием к определению его активности. Кроме того следует помнить, что максимальный рост активности фермента отмечается при таких миопатиях, как прогрессивная мышечная дистрофия.

Мышечные атрофии. В этой группе заболеваний мышц активность альдолазы сыворотки крови и других ферментов мышечного происхождения не изменяется.

Другие заболевания мышц. При миотониях рост активности альдолазы и трансаминазы невелик и непостоянен. Предполагалось, что при миотониях и миастениях будут обнаружены изменения активности холинэстеразы, как фермента нервных синапсов. Однако полученные результаты неудовлетворительны и неоднозначны. При хронических миозитах (*myositis chronica*) отмечен рост активности альдолазы. Рост активности альдолазы при дерматомиозитах (*dermatomyositis*) нормализуется после лечения кортикостероидами. Мышечные возбуждения, сопутствующие гипофункции щитовидной железы, вызывают умеренное повышение активности альдолазы.

Выводы. Из ферментов, имеющих в сыворотке крови, наиболее широкое применение в качестве диагностического теста при заболеваниях мышц нашла альдолаза. Она особенно пригодна в дифференциальной диагностике прогрессивной мышечной атрофии (*atrophia musculorum progressiva*) с другими заболеваниями мышц и особенно с атрофиями неврологического происхождения и миотониями. Отрицательной чертой фермента является неспецифичность его, как теста. Повышение уровня альдолазы отмечается при многих других заболеваниях (болезни печени). Ферментом, характеризующимся довольно

большой специфичностью для некоторых заболеваний мышц, и притом дающим значительно более высокий рост активности, чем альдолаза, является креатинкиназа. Отрицательной чертой ее как диагностического теста являются недостаточно разработанные методы определения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aronson S. M., Volk B. W.: Amer. J. Med. 1957, 22, 414. — 2. Baranowski T.: Zschr. Physiol. Chem., 1939, 260, 43. — 3. Bien E. J., Ziff M., Bunin J. J., Kadin H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1951, 76, 649. — 4. Dreyfus J. C., Kruh J., Schapira G.: Biochem. J., 1960, 75, 574. — 5. Dreyfus J. C., Schapira G.: Enzymes musculaires et sériques en pathologie musculaire. Régulations enzymatiques en clinique. Comptes rendus du 6e Congrès international de médecine interne. Basel 1960, A. Gigen, H. Ludwig; 145. — 6. Dreyfus J. C., Schapira G., Schapira F.: J. Clin. Invest. 1954, 33, 794. — 7. Engelhardt V. A.: Advanc. Enzymol., 1946, 6, 147. — 8. Kuhn E.: Klin. Wschr. 1959, 37, 236. — 9. Kuhn E., Wörner W.: Z. Klin. Med.; 1959, 155, 544. — 10. Schapira G., Dreyfus J. C.: Amer. J. Phys. Med.; 1959, 38, 207. — 11. Sibley J. A., Lehninger A. L.: J. Biol. Chem.; 1949, 9, 303. — 12. Weinstock I. M., Goldrich A. D., Milhorat A. T.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956, 91, 302.

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ

MARIAN ORŁOWSKI

БИОХИМИЯ И ФЕРМЕНТОЛОГИЯ ОПУХОЛЕЙ

ВСТУПИТЕЛЬНЫЕ ЗАМЕЧАНИЯ

Изучая биохимию опухолей, мы стремимся найти различия в химическом составе и метаболизме опухолевой и нормальной ткани, в надежде, что эти различия смогут явиться основанием для рациональной терапии опухолей. Данные, полученные до настоящего времени, хотя и увеличили значительно наши сведения о биохимии опухолей, не привели, однако, к обнаружению метаболических реакций или ферментных систем, которые были бы свойственны только злокачественным новообразованиям. Обнаруженные различия имеют скорее количественный, чем качественный характер. Сообщения об обнаруженных признаках, свойственных только злокачественным новообразованиям, не нашли подтверждения (102, 101). Например, не подтвердились данные Kögla согласно которым глутаминовая кислота в опухолях имеет конфигурацию D в отличие от нормальных тканей, где имеет место L-глутаминовая кислота (128). Отсутствие решительного прогресса в биохимии опухолей вероятно зависит прежде всего от недостаточных знаний, которыми мы обладаем, об основных жизненных процессах нормальных клеток, а тем более опухолевых клеток. Это прежде всего касается механизмов, управляющих ростом и размножением клеток, которые возможно являются ключом к пониманию опухолевого процесса. В краткой главе невозможно хотя бы поверхностно привести обзора ферментологии и биохимии новообразований. Поэтому ограничимся рассмотрением лишь отдельных вопросов ферментологии опухолевой ткани.

МЕТАБОЛИЗМ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ И ГИПОТЕЗА ВАРБУРГА

Первые научно обоснованные и систематические биохимические исследования метаболизма опухолей произвел Варбург и сотрудники (179). Он применил разработанную им манометрическую методику исследования дыхания и гли-

Таблица 18

Некоторые величины метаболизма для опухолевых и нормальных тканей

Ткань	I	II	III	IV	V	VI
	Q_{O_2}	$Q_{CO_2}^{O_2}$	$Q_{CO_2}^{N_2}$	$\frac{II}{I}$	$\frac{III-II}{I}$	$\frac{III-II}{III} \times 100$
Рак Flexner-Joblinga	7,2	25	31	3,5	0,9	20
Саркома Jensena (крыса)	9	17	34	1,9	1,9	50
Рак гортани (человек)	8	15	19	2,0	0,5	21
Саркома (человек)	4,9	15,6	29,9	3,2	2,9	48
Почки (крыса)	21	0	3,0	0	0,14	100
Печень (крыса)	12	0,6	3,0	0,05	0,20	80
Слизистая оболочка кишечника (крыса)	12	1,6	4,0	0,13	0,30	60
Кора мозга (крыса)	11	2,5	19,0	0,2	1,5	87
Сетчатка (крыса)	31	45	88	1,5	1,4	49
Зародыш (крыса)	13	6	23	0,6	1,3	74

I — Q_{O_2} = мм³ кислорода, поглощенного 1 мг ткани (сухой вес) в течение часаII — $Q_{CO_2}^{O_2}$ = кислородный гликолиз = мм³ CO₂, вытесненного из бикарбонатного буфера молочной кислотой, образующейся в аэробных условиях в расчете на мг ткани (сухой вес) в течение часаIII — $Q_{CO_2}^{N_2}$ = бескислородный гликолиз = мм³ CO₂, вытесненного из бикарбонатного буфера молочной кислотой, образующейся в бескислородных условиях, в пересчете на мг ткани в течение часа

IV — Коэффициент Варбурга

V — Коэффициент Meyerhofa

VI — Эффект Пастера, выраженный в процентах бескислородного гликолиза

гликолиза срезов нормальных и опухолевых тканей. Эти исследования позволили открыть некоторые черты метаболизма, которые до настоящего времени являются одним из наиболее постоянных свойств, отличающих опухолевую ткань от нормальной. Согласно Варбургу, метаболизм злокачественных новообразований характеризуется нормальным или несколько уменьшенным поглощением кислорода и высоким кислородным и бескислородным гликолизом. Гликолиз в присутствии кислорода является характерной чертой злокачественных новообразований, в отличие от бескислородного гликолиза, встречаемого также в нормальных тканях, особенно быстро растущих. Тогда, как в нормальных тканях бескислородный гликолиз почти полностью исчезает после подведения кислорода, то при злокачественных новообразованиях он удерживается и дальше на высоком уровне. Согласно Варбургу, в нормальных тканях дыхательный процесс способен подавить гликолиз, а при новообразованиях кислородный гликолиз продолжается независимо от интенсивности дыхательного процесса.

Высокий кислородный гликолиз и нормальное или уменьшенное поглощение кислорода обуславливает высокий коэффициент Варбурга, выражающий пропорцию между дыханием и ферментацией, и являющийся мерой количества молочной кислоты, образующейся несмотря на дыхание. Для некоторых злокачественных новообразований крыс этот коэффициент которых особо злокачественных новообразований можно изменить, обозначая как гликолиз, так равен 4. Коэффициент Варбурга можно изменить, обозначая как гликолиз, так и дыхание в количествах использованной глюкозы. Так как молочная кислота в числителе соответствует половине молекулы глюкозы, а кислород в знаменателе 1/6 молекулы глюкозы, то при опухолях отношение 4/1 можно заменить на 2 : 1/6 или 12/1. Это значит, что при очень злокачественных опухолях

крыс из 13 молекул глюкозы только одна подвергается окислению, а остальные гликолизу. Таким образом метаболизм новообразований является главным образом ферментативным метаболизмом в отличие от нормальных тканей, в которых в основном происходят процессы сгорания, и поэтому коэффициент Варбурга для этих тканей близок нулю. Работы Cori показали, что высокий гликолиз имеет место не только при исследовании срезов опухолевой ткани *in vitro*, но также и *in vivo* (49, 50). Венозная кровь, оттекающая от опухоли, содержит гораздо больше молочной кислоты и меньше глюкозы, чем артериальная кровь, снабжающая опухоль.

Высокий бескислородный и кислородный гликолиз обуславливает часто неполный эффект Пастера (торможение бескислородного гликолиза кислородом), зато коэффициент Meyerhof равен 1—2 и сходен с тем, который встречается в нормальных тканях, обладающих гликолизом. Такой коэффициент значит, что одна молекула кислорода, поглощенная опухолевой тканью, вызывает исчезновение, как и в нормальной ткани, 1—2 молекул молочной кислоты. Из этого факта Варбург сделал вывод, что пути метаболизма углеводов в опухолевой ткани не отличаются от таковых в нормальной.

Основываясь на своих данных Варбург выдвинул гипотезу, которая должна была бы объяснять образование опухолей. Первым этапом новообразования должно являться необратимое нарушение клеточного дыхания, заключающееся в редукции использования кислорода, или в расстройстве кислородного фосфорилирования, в результате чего образуются небольшие количества высокоэнергетических соединений и прежде всего АТФ по сравнению с кислородным фосфорилированием. Нормальная клетка покрывает свои энергетические потребности прежде всего в процессе дыхания и связанных с ним процессах кислородного фосфорилирования и лишь незначительная часть энергии образуется в процессе субстратного фосфорилирования, происходящего во время гликолиза. Энергия необходима клетке не только для химической работы, но также и для сохранения собственной структуры. Торможение дыхания вызывает нарушение клеточной структуры и потерю ее дифференциации. Клетки стараются компенсировать потерю энергии, черпаемой в процессе дыхания, энергией гликолиза. При этом часть клеток гибнет из-за отсутствия энергии, другие же справляются с задачей перехода на филогенетически более старый тип метаболизма, то есть черпая энергию из расщепления соединений (ферментация), а не из их окисления. Между расстройством дыхания и появлением гликолиза проходит определенное время, которое у человека может длиться годами. Это время по мнению Варбурга является скрытым периодом развития новообразования. Момент, когда клетка начинает покрывать свои энергетические потребности в процессе гликолиза, по мнению Варбурга связан с превращением нормальной клетки в опухолевую (20).

Гипотеза, выдвинутая Варбургом, поддерживается и развивается также в более новых работах этого автора и его сотрудников (178, 176, 181). Она вызвала ряд критических замечаний и дискуссию, в которой был выдвинут ряд аргументов, говорящих против этой концепции. Некоторые нерастущие нормальные ткани также обладают высоким кислородным гликолизом. Примером служит сетчатка (134), мозговая ткань (186), а в нормальных лейкоцитах кислородный гликолиз является основным направлением метаболизма (15). Перевиваемая гепатома мышей, вызванная кормлением их хризидином (3,1), обнаруживает нормальный кислородный гликолиз, значительную дыхательную активность, высокий эффект Пастера и низкий, близкий нулю коэффициент Варбурга (2). Некоторые идиопатические гепатомы у мышей обладали

рядом метаболических признаков, характерных для нормальной печени, и низким уровнем бескислородного гликолиза (54). Согласно постулату Варбурга, в процессе формирования новообразования метаболизм должен изменяться в направлении, характеризующем опухолевую ткань. Тем временем в печеночной ткани гликолиза не обнаружено. Высокий гликолиз имел место лишь в образовавшихся гепатомах (138).

Источником энергии для клетки являются высокоэнергетические соединения, прежде всего АТФ. Он образуется в процессе гликолиза и так называемого субстратного фосфорилирования, а также при кислородном фосфорилировании в процессе реакций цепи биологических окислений в митохондриях. Как в нормальной ткани, так и в опухолевой, дыхание связано с этерификацией неорганических фосфатов. Считается, что при перенесении пары электронов на кислород, в каждом из трех этапов транспорта электронов образуется фосфатное высокоэнергетическое соединение (104). Из этого следует, что на каждый атом использованного кислорода подвергаются этерификации 3 атома фосфатов (отношение $P : O$ равно 3). Согласно Варбургу, расстройство дыхательного процесса в опухолевых клетках не обязательно заключается в уменьшении усвоения кислорода (178), а может заключаться в диссоциации дыхания и кислородного фосфорилирования. Эту гипотезу трудно проверить, так как имеются трудности в оценке кислородного фосфорилирования, происходящего в неповрежденных тканях. *In vitro*, однако, обнаружено существование в опухолевой ткани механизмов, сопрягающих дыхание с этерификацией неорганических фосфатов (96, 196), а в митохондриях, изолированных из гепатомы, обнаружено то же самое отношение $P : O$ как в митохондриях печени при окислении кислот: янтарной, глутаминовой и α -кетоглутаровой (96). Наряду с этим однако обнаружено, что включение P^{32} в АТФ в опухолевых гомогенатах, инкубированных в присутствии кислорода с разными субстратами, было в сравнении с нормальными тканями очень небольшим (152). О наличии кислородного фосфорилирования в опухолевой ткани свидетельствует такое же, как в нормальной ткани, диссоциирующее влияние на эти процессы 2,4-динитрофенола (196).

Во время гликолиза образуется гораздо меньше энергии, чем во время дыхания. Во время расщепления одной молекулы глюкозы в процессе гликолиза образуются две высокоэнергетические связи, что обозначает прибыль 22 кал. В то же время окисление двух молекул пировиноградной кислоты доставляет 30 фосфатных связей высокой энергии, что дает прибыль 330 калорий. Из этого следует, что клетки, в которых происходят дыхательные процессы, находятся на более высоком энергетическом уровне, чем клетки, в которых происходит гликолиз. Приблизительные расчеты показали, что при очень злокачественных новообразованиях крыс, масса которых в течение суток увеличивается в 2 и даже 3 раза, на удовлетворение энергетической потребности достаточно только 10,8% энергии, образующейся во время дыхания, 26% энергии, образующейся в процессе бескислородного гликолиза и 21% энергии, образующейся в процессе бескислородного гликолиза (157). Из этого следует, что гликолиз может служить не только для покрытия энергетической потребности клетки. Его можно рассматривать не как причину опухоли, а как течение реакции, которую опухоль использует для поддержания своего роста. Рост тканей вероятно связан с гликолитическим обменом. Поэтому и в эмбриональных тканях имеет место гликолиз. Варбург сформулировал утверждение, что „нет роста без гликолиза“. Но нельзя утверждать обратного, так как имеются гликолизирующие ткани, не проявляющие роста (например сетчатка).

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ В ОПУХОЛЯХ И НОРМАЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Установлено, что в опухолевой ткани гликолиз переходит через все промежуточные этапы классической схемы Embden-Meyerhof-Parnas (135). В опухолевой ткани установлено наличие всех фосфорилированных промежуточных метаболитов глюкозы, а также коферментов (105). Ферменты цикла гликолиза размещаются в опухолях так же, как в нормальных тканях в растворимой фракции белков цитоплазмы (106). Ряд авторов сообщало о том, что в опухолевых тканях отмечается уменьшение системы цитохромоксидаза-цитохромы, что как будто бы подтверждает гипотезу Варбурга о расстройстве дыхательного процесса в опухолевой клетке (55, 154, 158, 97, 151). Подтверждением этого, казалось бы обнаружение того факта, что витамины из группы В встречаются в опухолевых тканях в меньшем количестве, чем в нормальных тканях (95). Это свидетельствует также о том, что цепь биологических окислений, находящаяся перед цитохромной системой, обладает меньшей активностью в опухолях. Также и активность каталазы в опухолях очень невелика (180).

Позднейшие исследования показали, что содержание цитохрома С в клетках асцитического рака Эрлиха является в пересчете на сухую массу клеток величиной того же ряда, как и в печени нормально кормленных крыс, и в 6 раз превышает содержание цитохрома С в селезенке (157). Сравнение содержания цитохрома С в ряде нормальных тканей и в опухолях показало, что количество цитохрома С при опухолях занимает промежуточное место между нормальными тканями, бедными цитохромом С (селезенка, легкие) и богатыми цитохромом (сердечная мышца). Такие же отношения отмечаются и в отношении цитохромоксидазы. Количество этого фермента в опухолях позволяет им многократно большее поглощение кислорода, чем это обычно наблюдается в экспериментах. Также и исследования содержания витаминов из группы В в опухолях показали, что они занимают промежуточное место между органами, богатыми и бедными этими витаминами (143, 170, 144, 171, 159). Исследования Chance и сотрудников с применением методики прямой спектрофотометрии в неповрежденных клеточных взвешях, привели к выводу, что в злокачественных клетках асцитического рака Эрлиха невозможно обнаружить расстройства дыхания (43). Степень биологических окислений при злокачественных опухолях, как и в нормальных тканях, вероятно ограничена активностью цитохромной системы. В опухолевой ткани активность этой системы значительно превышает наблюдаемое в экспериментах действительное потребление кислорода опухолевыми клетками. Этому утверждению не противоречит наблюдение, что в некоторых гепатомах имеется меньше цитохрома, чем в печени (77).

Bingold и сотрудники (18) отметили отсутствие порфиринов в некоторых опухолях человека, или же очень небольшое их количество. Из этого авторы делают вывод о расстройствах образования тетрапироловых систем в опухолевой ткани, что может являться причиной расстройства дыхания этих тканей. Это вероятно не относится ко всем опухолям, так как в гепатоме у мышей обнаружено значительное количество порфиринов (126).

В опухолевой ткани обнаружено наличие ряда дегидрогеназ, имеющих в нормальных тканях, а также оксидазы аминокислот, как и сукцинатоксидазы. Специфичность этих ферментов по отношению к коферментам такая же, как в нормальных тканях, а активность их не отличается от активности во многих нормальных тканях (58, 59, 122, 66, 195). Также коферменты НАД и НАДФ содержатся в опухолях в таком же количестве, как в нормальных тканях, причем окисленная форма нуклеотидов преобладает над редуциро-

ванной (42, 187). Также, как и в нормальных тканях, в опухолевой ткани имеется активный фермент, разлагающий НАД (НАД-аза) (176), ингибитором которого является амид никотиновой кислоты (38).

Промежуточный обмен углеводов и жиров, а также белков, соединяется воедино на уровне цикла лимонной кислоты, то есть цикла Кребса. Молекулы уксусной кислоты, образующиеся в процессе обмена этих соединений, вступают в этот цикл. Существуют основания к тому, чтобы принять, что в злокачественных новообразованиях реакции цикла Кребса протекают таким же образом, как в нормальных тканях. Гомогенаты опухолей обладают способностью окисления солей пировиноградной, лимонной, янтарной, фумаровой и яблочной кислоты со скоростью, близкой многим нормальным тканям, если будет прибавлено достаточное количество НАД. Опухолевые клетки могут образовывать лимонную кислоту из щавелевоуксусной кислоты и ацетата. После отравления малоновой кислотой в них как и в нормальных тканях, накапливается янтарная кислота (38, 39). Локализация ферментов цикла Кребса преимущественно в митохондриях, в опухолях не отличается от нормальной ткани.

Изотопные исследования с применением меченой глюкозы и жирных кислот показали, что опухолевая ткань обладает способностью сжигать глюкозу и жирные кислоты со скоростью, близкой нормальным тканям (189, 188, 120). Ферменты цикла Кребса в опухолях обладают такой же активностью, как в селезенке, зубной железе, легких и желудочной ткани, но меньшей, чем в сердечной мышце и печени (145).

На основании приведенных данных нам кажется, что не существует качественного различия в процессе углеводного, жирового и белкового обмена между нормальной и опухолевой тканью.

Реакция, управляющая гликолизом, вероятно является гексокиназной реакцией, в которой из АТФ и глюкозы образуется глюкозо-6-фосфат (37). Быстрая реакция фосфорилирования глюкозы является обязательным условием опухолевого гликолиза. Согласно Le Page (107) в нормальных клетках гексокиназная реакция находится под гормональным контролем и торможение ее обусловлено, вероятно, отсутствием гликолиза в нормальных тканях, несмотря на то, что они обладают такими же потенциальными возможностями гликолиза, если принять во внимание количество содержащихся в них гликолитических ферментов. Согласно Burk (37) причиной гликолиза в опухолевых тканях является уменьшение гормонального контроля и торможения гексокиназной реакции антиинсулиновыми гормонами. Исходя из этого положения, и принимая за Варбургом, что гликолиз является причиной злокачественного роста, Burk считает, что рациональная терапия злокачественных новообразований должна быть обоснована на применении ингибиторов гексокиназной реакции.

Активность α -глицерофосфатдегидрогеназы (фермента Барановского) в злокачественных новообразованиях совершенно отсутствует или очень невелика. Впервые на этот факт обратили внимание Holzer и сотрудники (87), исследуя активность этого фермента в асцитическом раке Эрлиха и в гепатоме Yoshida. Они также обратили внимание на значение отношения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) к активности фермента Барановского (GDH) в тканях. В нормальных тканях это отношение равно от 0,5 до 7,0, а при злокачественных новообразованиях от 10 до нескольких сот. Увеличение этого отношения в опухолевых тканях приводит по мнению Вохер и сотрудников (29, 28) к тому, что окисление $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$, образующегося в процессе гликолиза, происходит не за счет фосфодигидроксиацетона, а почти исключительно за счет пировиноградной кислоты, в результате чего образуется молочная кислота. Фосфо-

дигидроксиацетон, служащий в нормальных тканях в качестве акцептора водорода от редуцированной НАД, является соединением, которое может служить для внутриклеточного переноса водорода из внемитохондриального пространства внутрь митохондрий. Образующийся в результате редукции его α -глицерофосфат является субстратом, окисляемым ферментом, зависящим от флавина и находящимся в митохондриях. Таким образом окисление α -фосфоглицерина в митохондриях, а также редукция образовавшегося фосфодигидроксиацетона во внемитохондриальном пространстве, может составлять систему, транспортирующую водород внутрь клетки.

В злокачественных образованиях отмечается уменьшение или отсутствие как митохондриального фермента, так и растворимого фермента, действующего на α -глицерофосфат. Согласно цитированным выше авторам, отсутствие этой системы может иметь значение в объяснении гликолиза в опухолях, так как в этих условиях реоксидация НАД \cdot H_2 при помощи пирувиноградной кинслоты является для опухолей метаболической необходимостью.

Судьба глюкозо-6-фосфата, узлового метаболита обмена сахара, может иметь решающее значение в регуляции этого обмена как в нормальных, так и в опухолевых тканях. Это соединение может подвергаться изменению в направлении гликогена, пирувиноградной кислоты, пентозного цикла, или, наконец, подвергнуться дефосфорилированию до свободной глюкозы. Последняя реакция катализируется глюкозо-6-фосфатазой и имеет большое значение в регуляции уровня сахара в крови. В гепатоме крыс отмечено уменьшение активности фосфоглюкомутазы и фосфорилазы, увеличение активности ферментов, окисляющих глюкозо-6-фосфат и 6-фосфоглюконовую кислоту и отсутствие активности глюкозо-6-фосфатазы и фруктозо-1,6-дифосфатазы. Зато активность глюкофосфатизомеразы в сравнении с нормальной печеночной тканью увеличена. При хирургическом удалении рака толстого кишечника отмечается увеличение активности альдолазы в опухолевой ткани в сравнении с прилегающей нормальной тканью (160, 183, 184, 182, 82). В гепатоме содержится гораздо меньше гликогена, чем в нормальной печени (82). Такое соотношение активности ферментов в гепатоме, проводящих реакции в направлении гликогена и дефосфорилирования глюкозо-6-фосфата и увеличение активности ферментов обмена в направлении молочной кислоты, по мнению некоторых авторов приводит к ее накоплению в опухолевой ткани (9). Высокая активность ферментов пентозного цикла глюкозного обмена в злокачественных новообразованиях вероятно имеет значение в доставке пентоз, необходимых для синтеза нуклеиновых кислот.

Результаты, полученные при гепатомах, нельзя переносить на все новообразования, так как обнаружены метаболические различия даже между отдельными гепатомами. Так, например, в перевиваемой гепатоме у мышей отмечается нормальная активность глюкозо-6-фосфатазы (4).

ГИПОТЕЗА GREENSTEIN

На основании многочисленных исследований активности многих ферментов в нормальных и опухолевых тканях Greenstein выдвинул гипотезу, согласно которой по ферментному составу клетки различных опухолей больше похожи друг на друга, чем на клетки тканей, из которых эти опухоли происходят. Это зависит от гораздо большей ферментативной дифференциации нормальных тканей, чем опухолевых. Одним из признаков, свойственных опухолевым тканям, считается уменьшение активности цитохромной системы. Однако имеются нормальные ткани, которые содержат еще меньше цитохрома, чем селезенка и легкие. Ряд ферментов обладает в опухолях активностью, промежу-

точной между активностью в органах богатых и бедных этими ферментами (78).

При опухолевой трансформации происходят сходные изменения в активности ферментов. Например, активность цитохромоксидазы в тканях крысы колеблется от 92 единиц в легочной ткани до 974 единиц в сердечной мышце, зато диапазон колебаний активности этого фермента в 5 разных опухолях у крысы был значительно более узким, а именно от 62 до 134 единиц.

Сходство в биохимизме новообразований вероятно зависит от направленности всего ферментного аппарата на рост. Метаболизм новообразований следует скорее рассматривать не с точки зрения, что он является причиной опухолевого роста, а наоборот, что он служит росту новообразования. Поэтому сравнение ферментной активности опухолевой и материнской ткани не всегда отображает существо вопроса, так как обе эти ткани выполняют совершенно разные функции. Опухоль в своем метаболизме пользуется теми же ферментами и метаболическими реакциями, что и нормальная ткань.

Ткани здорового организма кроме анатомической и гистологической дифференциации, обладают также биохимической дифференциацией, в зависимости от выполняемой ими определенной функции в метаболизме организма, как целого. С ферментологической точки зрения эта дифференциация выражается наличием в этих тканях ферментов или систем ферментов, которых в других тканях нет или которые имеются лишь в очень небольшом количестве. Эта ферментологическая дифференциация обычно исчезает при развитии в данной ткани опухоли. В печени, например, можно обнаружить значительную активность аргиназы, каталазы, цистеиндесульфгидразы и большое количество фламина. Слизистая оболочка кишечника отличается большой активностью щелочной фосфатазы и эстеразы, а слизистая оболочка желудка обладает большой протеолитической активностью. В опухолях, исходящих из этих органов, активность перечисленных ферментов снижена или вообще отсутствует. В опухолях печени отсутствует целый ряд функций, выполняемых нормальной печеночной тканью (121), как: накопление гликогена, продукция кетонных тел из жирных кислот, а также синтез жирных кислот. Одной из специфических функций печени является способность к гликогеногенезу. Для исполнения этой функции необходимо наличие в печени двух специфических ферментов, то есть фруктозо-1,6-дифосфатазы и глюкозо-6-фосфатазы. В гепатоме Novikoff (9) этих обоих ферментов нет. Степень потери дифференциации опухолевой тканью может быть различной, и известны опухоли, которые обладают многими общими признаками с материнской тканью. Известно, что многие опухоли, исходящие из желез внутренней секреции, обладают выделительной функцией материнской ткани. *Sarcoma osteogenes*, опухоль, исходящая из кости, отличается высокой активностью щелочной фосфатазы, свойственной костной ткани. Также и некоторые перививаемые гепатомы мышцей обладают такой же, как нормальная печеночная ткань, активностью глюкозо-6-фосфатазы (4).

НЕКОТОРЫЕ ПРИЗНАКИ ОБМЕНА ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ, СВЯЗАННЫЕ С РОСТОМ

Гликолиз опухолевой ткани, как уже было указано выше, вероятно прежде всего служит процессу роста. Включение меченного фосфора в нуклеиновые кислоты и фосфопротеиды в кислородных условиях и при наличии глюкозы, зависит в опухолях от течения гликолиза (116). Большая часть высокоэнерге-

тических соединений образуется в опухолях при фосфорилировании субстратов в процессе гликолиза (48, 56). Включение гистидина и серина срезами быстро-растущих опухолей крысы зависит от гликолитических реакций, и происходит в жидкости Рингера, содержащей глюкозу, с такой же скоростью в присутствии кислорода, как и в бескислородных условиях (133). Это включение не зависит исключительно от дыхания опухолевой клетки, и при отсутствии глюкозы уменьшается даже в аэробных условиях. Приток энергии необходим для использования срезами опухоли аминокислот из среды. Срезы гепатомы в 7 раз быстрее поглощают из среды глицин и аланин, чем срезы печени. Однако *in vivo* опухоль поглощает не больше аминокислот, чем печеночная ткань (204, 79). Возможно, что это зависит от того, что *in vivo* потенциальная метаболическая способность опухолей не используется целиком из-за ограничения кровообращения и некролиза.

Исследования с мечеными аминокислотами показали, что опухоль может расти за счет аминокислот тканей хозяина. В то время, как метаболически активные ткани хозяина теряют свои меченные аминокислоты после прекращения их введения, опухоль в это время присваивает себе эти меченные аминокислоты. Синтез белков из аминокислот в опухоли преобладает над их катаболизмом. Это склонило Mider и сотрудников (127) выдвинуть концепцию так называемой „азотной ловушки“ в опухолях. Белок, образующийся в опухоли, вероятно потерян для промежуточного обмена организма, отягощенного опухолью. Даже у голодающих животных белки злокачественной опухоли Flexner-Jobling недоступны общему обмену организма (173). В опухоли вероятно существует только одно направление обмена — в направлении синтеза белка, а катаболизм белка в опухоли происходит очень медленно. Имеются даже предположения, что рост количества белка в опухоли скорее является результатом пониженного катаболизма белков, чем более быстрого их синтеза (71). Энергию, необходимую для синтеза пептидной связи, новообразование получает из гликолитических реакций. В связи с этим прибавление глюкозы не влияя на дыхание, увеличивает включение в белки опухоли таких меченных аминокислот, как аланин, лейцин, глицин и фенилаланин. Такие яды гликолиза, как йодацетат, соединения фтора и мышьяка, тормозят включение аминокислот в белки опухоли.

При гепатоме Novikoff обнаружено отсутствие ряда ферментов, катаболизирующих аминокислоты. Эта опухоль не содержит триптофаноксидазы, тирозинтрансаминазы, фенилаланингидроксилазы, треониндегидразы, цистеиндесульфгидразы, сериндегидразы, гистидазы и п-гидроксифенилпируват-оксидазы. Триптофаноксидазы, тирозинтрансаминазы и треониндегидрогеназы не удалось индуцировать в опухоли путем добавления субстрата. По сравнению с печенью, активность глутаминсинтетазы и аргиназы в опухоли была меньшей, а аспартаттранскарбамилазы в 4 раза большей, чем в печени (10). В той же опухоли установлено уменьшение активности катепсина и отсутствие глутаматдегидрогеназы (7). Предполагается, что уменьшение активности или отсутствие ферментов, катаболизирующих аминокислоты, может являться одной из причин уменьшенного катаболизма белков и их увеличенного синтеза.

Можно с уверенностью сказать, что понимание значения обмена нуклеиновых кислот в значительной степени поможет понять процессы опухолевого роста. Многие данные свидетельствуют о том, что дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК), субстанция, содержащаяся в хромосомах, детерминирует наследование и перенос признаков от клетки к клетке. Ядерная ДНК вероятно является единственной субстанцией, способной к переносу генетических информации. В злокачественных опухолях замечены изменения в хромосомах

и ДНК. Большинство нормальных соматических клеток содержит диплоидное (2) количество хромосом, характерных для данного вида. Только 1—2% клеток являются полиплоидными. В гепатоме Novikoff имеется 60% диплоидных клеток и около 40% тетраплоидных. В опухолях довольно часто встречаются также гетероплоиды и анейплоиды. Кроме количественных изменений хромосом в раковых клетках наблюдаются также морфологические изменения их, ненормальные митозы и так далее. В соответствии с этим во многих опухолевых клетках отмечается увеличение количества ДН кислоты (98).

Включение изотопа P^{32} в ДНК в опухолях было гораздо большим, чем в ДНК всех тканей, за исключением кишечника и селезенки (71). Это стоит в связи с большей митотической активностью опухоли. Включение изотопа муравьиной кислоты в ДНК опухоли было большим, чем в ДНК нормальных тканей. Такие же пропорции замечены относительно использования аденина для синтеза пуринов в ДНК и использование ацетата C^{14} для синтеза нуклеиновых кислот в срезах опухоли (71).

Активность аспартат-трансаминазы в гепатоме превышает в 2—4 раза активность ее в печени, в клетках асцитического рака Эрлиха активность ее в 1,5—3 раза больше, чем в гепатоме (10, 40). Возможно, что это зависит от значения этого фермента в регуляции синтеза нуклеиновых кислот, а также связи его со скоростью клеточного деления. В регенерирующей печени после гепатэктомии активность этого фермента также увеличивается и достигает максимума через 24—48 часов (40, 41). В гепатоме Novikoff обнаружена меньшая, чем в печени, активность 5-нуклеотидазы, гванизы, аденазы и нуклеозидфосфорилазы, а также отсутствие ксантиноксидазы и уреазы. Авторы предполагают, что катаболизм пуринов в этой опухоли расстроен и блокируется на уровне ксантина и гипоксантина. Отсутствие деградации пуриновых производных в опухолях может являться одной из причин увеличенного синтеза нуклеиновых кислот ввиду увеличенной метаболической пропорции предшественников этих соединений (103, 60).

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ, ОТЯГОЩЕННОМ ОПУХОЛЮ

Растущая опухоль оказывает разнообразное влияние на организм носителя. В этой главе мы остановимся только на тех изменениях, которые опухоль вызывает в органах, отдаленных от места ее роста, а также изменениях в метаболизме организма, как целого и не будем останавливаться на изменениях, вызванных непосредственным влиянием опухоли на ткани, в которых опухоль развивается.

Вначале опухоль берёт азотистые вещества из пищи, получаемой хозяином. Однако позднее, по мере ее роста, опухоль берет азотистые вещества и из белков хозяина, азотный баланс которого становится отрицательным. Увеличенный приток калорий приводит в этих случаях только к ускоренному росту опухоли, не оказывая существенного влияния на состояние питания хозяина. Кормление животных, отягощенных опухолью, диетой, бедной белками, замедляет, но не тормозит роста опухоли. Опухоль обладает способностью мобилизовывать азотистые продукты хозяина и изолировать их для собственной пользы, но белки опухоли недоступны метаболизму организма носителя. Отсюда и выдвинутая концепция „азотной ловушки“ опухолей, о чем речь была в предыдущей главе (127).

В сыворотке больных с опухолью отмечаются белковые изменения в виде уменьшения общего количества белка, уменьшения количества альбуминов и увеличения главным образом α -глобулинов и фибриногена. Эти изменения некоторые авторы пробовали использовать в диагностических целях, но они не являются достаточно специфическими, и не выступают достаточно рано, чтобы годиться для этой цели. Описано также увеличение количества мукопротеинов в плазме опухолевых больных (197). Brdicka описал у больных с опухолями снижение в сыворотке полярографической волны, вызванной каталитической редукцией водородного иона кобальт — сульфгидриловым комплексом, образуемым только белками, содержащими сульфгидрильную группу (35).

Отдельное место в белковых изменениях занимает увеличение глобулиновой фракции в сыворотке при множественной миеломе, а также появление в моче белка Bence-Jones.

У больных опухолями очень часто имеет место уменьшение количества гемоглобина и эритроцитов. Причиной этой анемии считается токсическое влияние опухоли на эритропоэз, дополнительные инфекции, кровотечения, а также уменьшение синтеза гемоглобина в костном мозге. В последнее время в качестве причины анемии у больных с опухолями подчеркивается существующий часто гемолиз, которого не может компенсировать нормальная, а даже и усиленная регенерация эритроцитов в костном мозге (91). Примерно у 75% больных с опухолями имеют место симптомы анемии. Причиной анемии часто являются также метастазы опухоли в костный мозг. Существуют сторонники взгляда, что опухоль влияет тормозящим образом на регенерацию эритроцитов путем выделения токсинов, по типу влияния опухоли на уменьшение активности каталазы в печени у животных с новообразованиями.

Также, как у голодающих животных, в печени животных с опухолями имеется мало гликогена (69). Мыши с новообразованиями после нагрузки глюкозой откладывают меньше гликогена, чем контрольные животные. Это может зависеть от большой потребности опухоли в углеводах; таким же образом объясняется частое снижение уровня сахара в крови животных, страдающих опухолями. Известны клинические наблюдения о смягчении симптомов существующего сахарного диабета у больных с опухолями. У животных с новообразованиями наблюдается уменьшение запасов жиров в виде уменьшения количества жировой клетчатки. Нагрузка таких животных диетой, богатой жирами, вызывает у них значительный рост уровня жиров в крови и появление высокой липемии в плазме. Это явление некоторые авторы связывают с уменьшением активности липопротеинлипазы у больных с опухолями (17).

Изотопные анализы указывают на большую скорость синтеза нуклеиновых кислот в тканях животных с новообразованиями. Установлено увеличенное включение изотопа P^{32} в ДНК печени, селезенки и почек у мышей с опухолями (94, 139). Также, как выражение усиленного обмена нуклеиновых кислот, описано усиленное включение в ДНК и РНК 4-амин-5-имидазолкарбоксиамида, аденина 8- C^{14} , гуанина, гипоксантина и глицина (13).

Животные с опухолями обычно съедают меньше пищи, чем контрольные, и количество съеденной ими пищи уменьшается вместе с ростом опухоли. Одновременно с этим увеличиваются калорические потребности животных с опухолями, что приводит к разложению белков тканей хозяина, а освободившиеся азотистые вещества используются опухолью. У животных с новообразованиями описано увеличение надпочечников (118), чему обычно сопутствует инволюция зубной железы. В надпочечниках этих животных описано уменьшение количества аскорбиновой кислоты (165) и холестерина.

Причиной этого вероятно является значительная гиперфункция надпочечников у животных с новообразованиями, о чем свидетельствует также увеличенное выделение с мочой метаболитов надпочечников. Считается, что причиной увеличения надпочечников у животных с новообразованиями является усиленное выделение АКТГ и стимуляция оси гипофиз — надпочечники.

Каталаза. Уменьшение активности каталазы (КТ) в печени впервые отметил Brahn (33), производя исследование трупов с различными новообразованиями. Более поздние данные, главным образом Greenstein и сотрудников, подтвердили эти наблюдения. Установлено, что активность КТ в печени уменьшается лишь тогда, когда вес опухоли составляет примерно 5% веса тела носителя и падает с ростом веса опухоли до активности иногда в 20 раз меньшей, чем в норме. Через 1—3 дня после хирургического удаления опухоли активность КТ возвращается к норме (76). Опухоли, растущие быстрее, вызвали наибольшее уменьшение активности КТ в печени, причем падение активности фермента прогрессирует с ростом опухоли, достигая минимальных величин перед смертью. Уменьшения активности КТ не отмечается при быстром росте неопухолевых тканей, как, например, эмбриональной ткани (73). Установлено, что уменьшение активности КТ не является результатом пониженного питания животных, а высокобелковая диета не предотвращает падения активности КТ в печени у животных с новообразованиями (74, 185).

Дальнейшие успехи в изучении проблемы КТ получены японскими учеными. Nakahara и Fukuoka (132) получили сырую фракцию из опухолей человека, которая вызывала снижение активности КТ в печени мыши. Препараты, полученные таким же образом из нормальных тканей, не вызывали такого эффекта. Активная субстанция была названа токсогормоном. Все, исследованные до настоящего времени новообразования, как у людей так и у животных, оказались хорошим источником токсогормона. Исследования Nakagawa (131) показали, что в гомогенатах из *sarcoma Yoshida* и *ascites hepatoma*, токсогормон связан с микросомальной фракцией и фракцией растворимых белков цитоплазмы. Митохондрии и клеточные ядра не обладали активностью. Затем наличие токсогормона обнаружено в моче, экссудативной жидкости, плазме и желудочном соке больных с новообразованиями желудка. Попытки использовать исследование токсогормона в целях диагностики злокачественных новообразований до настоящего времени не увенчались успехом.

Токсогормон вероятно является белком или полипептидом. Оно получило кристаллическую фракцию, которая в дозе 0,2 мг снижала активность КТ в печени мышек. Эта фракция имела характер полипептида, молекулярная масса ее равнялась примерно 4000 (136). Неизвестно, является ли эта фракция чистым токсогормоном, или содержит его в качестве примеси. Токсогормон не является ингибитором КТ *in vitro*. Торможение КТ *in vivo* может происходить путем влияния на обмен железа, так как было замечено, что введение солей железа предупреждает в значительной степени уменьшение активности КТ в печени животных, отягощенных новообразованиями. Возможно, что КТ в печени животных, которое он оказывает на активность КТ, оказывает токсогормон, кроме влияния, которое он оказывает на активность КТ, оказывает также влияние на метаболизм других ферментов, содержащих в своей протетической группе железо. Kampschmidt и сотрудники (92) установили, что введение токсогормона (экстракт из *carcino-sarcoma Walker*) здоровым крысам вызывает анемию, снижение уровня железа плазмы, снижение активности КТ печени и почек, увеличение веса печени, селезенки и надпочечников и инволюцию зубной железы. Эти изменения часто наблюдаются у животных с новообразованиями. Уровень железа был в 200—500 раз более

чувствительным к токсогормону, чем КТ печени (92). Опухолевые ткани содержат очень мало КТ. Предполагается, что это связано с выделением токсогормона опухолевыми клетками.

Кроме изменения активности КТ описаны многочисленные изменения активности других ферментов в тканях животных с новообразованиями. Гомогенаты печени крысы с *carcino-sarcoma* Walker обладали гораздо большей активностью цитохромоксидазы, чем контрольные животные (72). В печени мышцей с опухолями отмечено уменьшение активности Δ -аминлевулиндегидрогеназы, фермента, принимающего участие в синтезе порфибилиногена, что может стоять в связи со снижением активности КТ (172). Активность аргиназы в печени крыс с опухолями уменьшается (75), а у мышцей отмечено уменьшение активности глюкозо-6-фосфатазы (183). Ткани животных, страдающих опухолями, проявляют меньшую эстеразную и липазную активность. Ксантиноксидаза в печени реагирует уменьшением активности при ограниченном количестве белка в диете. Greenstein и сотрудники отметили нормальную активность ксантиноксидазы в печени крыс с новообразованиями (75). У крысы без опухолей с пониженным питанием, близким к питанию крыс с опухолями, обнаружено снижение активности ксантиноксидазы. Наличие опухоли, таким образом, вероятно поддерживает нормальный уровень активности ксантиноксидазы, несмотря на пониженное питание животных. Животные с новообразованиями, которых держали на диете, бедной белками, вызывающей уменьшение активности ксантиноксидазы в печени нормальных крыс, обнаруживают нормальную активность этого фермента (16). Мы считаем, что это свидетельствует о том, что опухоль влияет на увеличение активности ксантиноксидазы в печени носителя.

ФЕРМЕНТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СЫВОРОТКЕ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Вводные замечания. В сыворотке больных со злокачественными опухолями можно часто обнаружить увеличение активности одних ферментов и уменьшение других. Неоднократно производились попытки использовать эти изменения в целях диагностики новообразований. Однако результаты, полученные до сих пор, не могут нас удовлетворить, так как хотя мы и можем при помощи ферментологической методики иногда разрешить сомнительный диагностический вопрос относительно запущенной опухоли, то однако до сих пор не удалось разработать ферментативной пробы, которая давала бы результаты в раннем периоде новообразовательного процесса. Отчетливые ферментативные изменения появляются в сыворотке лишь при далеко зашедшем и диссеминированном процессе.

Источником увеличения активности фермента в сыворотке может являться усиленное выделение его опухолью в кровяное русло. Sibley и сотрудники (162) показали, что венозная кровь, оттекающая от опухоли, обладает большей активностью альдолазы, чем циркулирующая кровь в организме. Источником фермента может быть увеличенная проницаемость опухолевой клетки для некоторых ферментологически активных белков, особенно в частях опухоли с недостаточным кровоснабжением. Ферменты, появляющиеся в кровяном русле, могут происходить из малых и больших некротических очагов, которые имеются в опухоли. После хирургического удаления опухоли ферментативная активность сыворотки может вернуться к норме в течение 12 часов. Исследования Sibley и сотрудников показали, что активность альдолазы у крыс, которым был привит саркомо-рак 256 Walker, увеличивается между 7 и 17

днями после прививки опухоли, когда вес опухоли уже относительно велик (161, 162). Так же обстоит дело глюкозофосфат-изомеразой (24).

Активное выделение фермента опухолью в кровь имеет место, как нам кажется, при *sarcoma osteogenes*, приводящей к увеличению щелочной фосфатазы в сыворотке (198). Источником фермента в сыворотке могут являться нормальные ткани, инфильтрированные и разрушенные опухолью. Это наиболее вероятно прежде всего при первичных и метастатических опухолях печени, при которых наблюдается увеличение активности многих ферментов в сыворотке. Адаптивное увеличение синтеза фермента и выделение его в сыворотку печенью, имеющей опухоль, может также являться фактором, влияющим на увеличение активности его в сыворотке (167, 168). Варбург и сотрудники (176) заметили, что активность альдолазы в жидкости увеличивается во время инкубации асцитического рака мыши в бескислородных условиях. В присутствии кислорода не наблюдалось перехода фермента в инкубационную жидкость. Отсутствие глюкозы в среде увеличивает еще больше, чем отсутствие одного лишь кислорода, переход фермента из клеток в среду (155).

Принято считать, что при диссеминированном опухолевом процессе источником увеличения активности лактатдегидрогеназы сыворотки могут быть мышцы (192). Для определения источника повышения активности фермента в сыворотке производились сравнения активности разных ферментов в сыворотке с активностью этих же ферментов в разных тканях, а также применялись иммунохимические методы исследования (22, 156).

На степень увеличения активности фермента в сыворотке влияет не только переход его из соответствующих тканей в кровяное русло, но и скорость удаления фермента из организма. Путем расчета установлено, что переход 2—3 мг ферментативно активного белка в кровяное русло у человека может вызвать такое изменение его активности в сыворотке, которое можно определить при помощи применяемых в настоящее время ферментологических методов (23).

ЩЕЛОЧНАЯ ФОСФАТАЗА (ЩФ)

Активность щелочной фосфатазы в сыворотке увеличивается при механических желтухах, причем, некоторые авторы считают, что особенно значительное увеличение активности фермента имеет место при закупорке желчных путей опухолью. У 70% больных с опухолями и механической желтухой активность этого фермента колебалась в границах 40—70 единиц Bodansky (51). Однако при помощи этого анализа невозможно отличить механической желтухи, вызванной опухолью, от желтухи, вызванной камнями общего желчного протока. Очень часто увеличение активности щелочной фосфатазы в сыворотке наблюдается при первичных и метастатических опухолях печени. Согласно Bodansky и сотрудникам (123) у 78% больных с метастазами в печень отмечалось увеличение активности щелочной фосфатазы, несмотря на отсутствие желтухи, и только у 10% больных с опухолями без метастазов в печень. Степень увеличения активности фермента не зависит от величины и количества метастазов.

При остеогенной саркоме остеобластического типа активность щелочной фосфатазы в сыворотке увеличивается, превышая в 20—40 раз нормальную активность (65). Это объясняется большой ферментной активностью опухоли. При остеолитическом типе остеогенной саркомы активность этого фермента остается нормальной или повышается лишь незначительно (200). Хирургическое удаление или облучение опухоли лучами X вызывает уменьшение активности фермента в сыворотке, а новый рост опухоли снова вызывает увели-

чение его активности. При других первичных опухолях кости активность щелочной фосфатазы может быть нормальной, или слегка увеличенной, если росту опухоли сопутствует остеобластическая реакция. Доброкачественные костные опухоли не дают изменений ферментов в сыворотке. Уничтожение костной ткани при миеломатозе протекает при нормальной активности щелочной фосфатазы, или только со спорадическими ее повышениями (14).

При опухолевых метастазах в кости активность фермента зависит от того, имеют ли метастазы остеобластический, или остеолитический характер. Метастазы рака грудной железы, которые обычно носят остеолитический характер, протекают с нормальной или лишь слегка увеличенной активностью щелочной фосфатазы сыворотки, а метастазы рака предстательной железы, обычно остеобластического характера, часто дают рост активности этого фермента в сыворотке. Аденомы паращитовидных желез в большом проценте случаев вызывают увеличение активности ЩФ в сыворотке. Gutman и сотрудники отметили увеличение активности у всех 28 обследованных больных с аденомой паращитовидных желез (81). Увеличение активности щелочной фосфатазы описано также при раке паращитовидных желез (124). Повышенная активность щелочной фосфатазы в патологическом экссудате или в сыворотке вероятно свидетельствует об ее опухолевом происхождении (114).

КИСЛАЯ ФОСФАТАЗА (КФ)

Тканью, содержащей наибольшее количество кислой фосфатазы у человека, является предстательная железа. Согласно Bodansky (25) из 567 больных раком предстательной железы у 325 отмечено повышение активности кислой фосфатазы в сыворотке. Только у 24% больных без метастазов активность была повышена, зато в группе с метастазами число положительных результатов равнялось 81%. Процент увеличения активности кислой фосфатазы у больных раком предстательной железы и метастазами колеблется, на материале разных авторов, от 59 до 89%. Согласно исследованиям Woodard (199) другие заболевания, кроме рака предстательной железы, не вызывают увеличения активности кислой фосфатазы сыворотки. Из этого вытекает, что исследование активности КФ в сыворотке является специфическим тестом для диагноза рака предстательной железы.

Механизм увеличения активности КФ при раке предстательной железы окончательно не изучен. Неоднократно подчеркивалось, что измененная раковой опухолью предстательная железа содержит меньше фермента, чем нормальная железа (198). Предполагается, что причиной может являться инвазия лимфатических сосудов в опухоль и выделение фермента в кровяное русло вместо протоков железы. Метастазы рака предстательной железы ведут к дополнительному увеличению активности КФ в сыворотке, так как они обычно содержат большое количество фермента (80).

Fishman и сотрудники старались определить в сыворотке более специфическую часть активности КФ, источником которой является предстательная железа, путем использования тормозящего действия на этот фермент L-тартрата (61, 62). При этом исследовании у 15% больных без метастазов отмечалось увеличение уровня активности „общей“ КФ, в то время, как уровень „простатической“ КФ увеличен у 80% больных. При наличии метастазов этот процент увеличивался до 85. Некоторые авторы подтвердили приведенные Fishman данные, утверждая, что значительная часть больных с раком предстательной железы, у которых активность „общей“ КФ была нормальной, имела увеличенную активность „простатической“ КФ. Однако не все авторы приводят такой высокий процент положительных результатов (84). Не отмечено

прямой корреляции между активностью КФ и величиной опухоли или ее метастазов.

Лечение эстрогенами приводит к уменьшению активности фермента в сыворотке, в зависимости от уменьшения части активности, восприимчивой к тартрату. Этому сопутствует параллельное улучшение клинического состояния больных. Быстрое падение активности наблюдается также после кастрации (90). Перерыв в лечении эстрогенами у большинства больных приводит к увеличению активности „простатической“ КФ, чему сопутствует клиническое ухудшение состояния больного. Увеличение активности КФ часто свидетельствует о диссеминации и увеличении метастазов опухоли. Поэтому наблюдая за изменениями активности фермента в сыворотке крови больных, можно следить за течением заболевания.

Применение андрогенов вызывает увеличение активности КФ в сыворотке, что можно использовать для диагностики. Такое же явление отмечено после массажа предстательной железы, ощупывания, или даже после катетеризации (86, 52). В случаях диагностически неясных предложено производить так называемые провокационные тесты, после чего измеряют активность фермента в сыворотке. Увеличение активности после провокации свидетельствует об опухоли. С этой целью предложено вводить больным три раза в неделю по 50 мг тестостерона (27, 63). Другую пробу предложил London. Она заключается в том, что температуру тела больных снижают путем применения хлорпромазина и охлаждения в течение 18 часов до температуры 35—36°. При раке предстательной железы с метастазами дело доходит до трехкратного увеличения активности КФ (112). Повышение температуры тела приводит к уменьшению активности КФ в сыворотке.

Ввиду специфичности увеличения КФ при раке предстательной железы, и значения этого исследования для относительно ранней диагностики заболевания, некоторые авторы предлагают производить этот анализ как правило у всех больных в возрасте выше 50 лет. Bonner и сотрудники (27), производя это исследование у 221 больных, обнаружили у 5 увеличение активности КФ, причиной чего был рак предстательной железы, о котором перед этим никто не подозревал. При обычной аденоме предстательной железы и ее воспалении активность КФ сыворотки как правило бывает нормальной. Увеличение активности КФ иногда отмечалось у больных раком молочной железы, однако „простатическая“ часть активности осталась нормальной (63).

АЛЬДОЛАЗА (АЛД)

Увеличение активности альдолазы в сыворотке крыс с новообразованиями впервые описали Варбург и Christian (177). Активность зависела от величины опухоли и достигала уровня, превосходящего нормальный в 7 раз. Дальнейшие исследования показали, что кровь, оттекающая от опухоли, обладает большей активностью, чем кровь из сердца, а после удаления опухоли, падает. Облучения лучами X или лечения цитостатическими препаратами, наступают падение активности АЛД (162). Однако увеличение активности фермента имело место только у 20% больных с новообразованиями (161). Более частое увеличение активности фермента отмечается у больных с раком предстательной железы (11). У 12 из 16 больных с запущенным нелеченным раком предстательной железы отмечалось увеличение активности АЛД. Кастрация, адrenalectомия и лечение эстрогенами приводили к уменьшению активности АЛД, а после введения тестостерона — активность ее увеличилась. Исследование активности АЛД можно использовать для наблюдения за эффектом лечения.

ГЛЮКОЗОФОСФАТ-ИЗОМЕРАЗА (ГФИ)

Bodansky установил, что активность ГФИ в сыворотке у больных раком молочной железы и метастазами в кости иногда увеличивается до высоких величин. Отмечался параллелизм между степенью увеличения активности фермента и величиной и распространением опухолевого процесса в костях. Многократное увеличение активности фермента наблюдается также у больных с опухолевыми метастазами в печень, и в меньшей степени — в селезенку. Также и при раке предстательной железы отмечается увеличение активности ГФИ сыворотки, параллельное величине опухолевого процесса и степени его генерализации. Увеличение активности ГФИ описано при острых и хронических миелоидных лейкозах, но не при лимфоидных лейкозах (21). У больных с разными опухолями увеличенная активность ГФИ в сыворотке имела место в 60% случаев, а у больных с метастазами в печень активность была повышена в каждом случае (99). Активность часто увеличивается у больных с болезнью Hodgkina. Merten и сотрудники (125), исследуя активность 26 ферментов гликолиза, пентозного цикла и цикла Кребса, обнаружили при новообразованиях существенное увеличение активности лишь ГФИ, лактатдегидрогеназы и фосфоглюкоматазы. Не было существенного различия между опухолевой группой и группой больных с неспецифическими воспалительными процессами. Лишь отдельные авторы считают, что исследование активности ГФИ у больных с опухолями не имеет никакого значения (147, 148). Экссудативные жидкости опухолевого происхождения обычно отличаются высокой активностью ГФИ (166).

ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗА (ЛДГ)

Привитие опухоли крысам и мышкам вызывает увеличение активности ЛДГ и глутатионредуктазы в плазме этих животных, причем активность ЛДГ увеличивается быстрее и достигает более высоких величин, чем глутатионредуктаза (117, 89). Активность ЛДГ в плазме у мышей увеличивается через 48 часов после прививки им лейкоза, когда еще не удавалось обнаружить изменений в картине крови, а ни опухоли (85).

Увеличение активности ЛДГ сыворотки у больных с новообразованиями появляется однако лишь тогда, когда уже имеются расстройства общего состояния больных (113). Увеличение активности ЛДГ отмечено больше, чем у 70% больных с острым и у 90% больных с хроническим миелоидным лейкозом. При лимфоидном лейкозе увеличение активности этого фермента отмечается значительно реже, а при алейкемическом лейкозе изменений не отмечается (115, 21). Активность ЛДГ как и ГФИ увеличивается в периоде рецидивов лейкоза и уменьшается при ремиссии, причем имеется параллелизм между активностью фермента и числом лейкоцитов в периферической крови. Уменьшение активности ЛДГ иногда является более ранним предвестником ремиссии, чем уменьшение количества лейкоцитов в периферической крови (21). Разные авторы приводят разную частоту увеличения активности ЛДГ в сыворотке больных с новообразованиями. Одни авторы приводят только 40% положительных результатов (113) другие даже 90% (83). Чаще приводятся средние величины в границах 60—70% случаев (19, 147). Увеличение активности фермента обычно проявляется в позднем периоде опухолевого процесса при появлении метастазов, главным образом в печени (205, 88, 191).

Согласно Wróblewski определение активности ЛДГ в патологических экссудатах и спинномозговой жидкости может помочь в диагностике опухолевой этиологии заболевания (201). Отмечается гораздо большая активность ЛДГ

в опухолевых экссудатах, чем в экссудатах и транссудатах другой этиологии (53, 201, 202). Активность ЛДГ в экссудатах, содержащих опухолевые клетки, превышает активность ее в сыворотке.

АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗА (АД)

Straub и сотрудники (164) описали увеличение активности аденозиндезаминазы (АД) в сыворотке у 92% больных из большой группы больных со злокачественными новообразованиями (527 случаев). Эти данные частично подтвердили Letnański и сотрудники (108), которые однако обнаружили увеличение активности этого фермента также при воспалительных состояниях, особенно при туберкулезе легких. Более поздние исследования не подтвердили этих данных, так как процент больных с положительными результатами оказался гораздо ниже (100). Постоянное повышение активности АД описано при острых лейкозах у детей, причем активность фермента соответствовала клиническому состоянию детей, ремиссиям и обострениям заболевания (153).

γ -ГЛУТАМИЛ-ТРАНСПЕПТИДАЗА (ГГТП)

Активность этого фермента повышается прежде всего при опухолях печени, как первичных, так и метастатических (167, 168, 169), достигая иногда величин 100-кратно превосходящих норму. Активность фермента повышается также при отсутствии желтухи и наблюдается у всех больных. У больных с новообразованиями других органов активность этого фермента в сыворотке остается нормальной или повышается лишь незначительно, если, конечно, нет метастазов в печень (99).

β -ГЛЮКУРОНИДАЗА (β -ГР)

Boyland и сотрудники (30) в моче у больных раком мочевого пузыря обнаружили увеличение активности β -ГР, которая оставалась повышенной и после операционного удаления опухоли. Увеличение активности фермента в этих случаях не зависит от сопутствующей обычно инфекции мочевых путей. Опухоли мочевого пузыря обычно обладают более высокой активностью β -ГР, чем ткань мочевого пузыря. Увеличению активности β -ГР в моче эти авторы приписывают патогенетическое значение в образовании рака мочевого пузыря. У людей, занятых в промышленности, где они имеют контакт с α и β -нафтиламином и бензидином, рак мочевого пузыря встречается чаще. Эти соединения подвергаются метаболизму в печени до орто-аминофенолов и удаляются с мочой в виде соединений с глюкуроновой и серной кислотой. Имеющаяся в моче β -ГР гидролизует глюкуронаты этих соединений, приводя к освобождению орто-аминофенолов, о которых известно, что в эксперименте (2-амино-1-гидроксинафтален) вызывают у мышей и собак рак мочевого пузыря. Некоторые орто-аминофенолы возникают физиологическим путем в процессе обмена триптофана и выделяются с мочой. Это 3-гидрокскину-ренин и 3-гидроксинантраниловая кислота. Усиленная активность β -ГР в моче таким образом способствует освобождению канцерогенных соединений из их продуктов детоксикации.

В моче больных с другой локализацией опухоли активность β -ГР иногда также была повышенной, но ни в одной из групп больных не отмечено, чтобы все результаты исследования лежали за пределами величин, характерных для здоровых людей (31). Предложено применение ингибитора β -ГР, 1:4-сахаро-лактона у людей, периодически подвергающихся воздействию канцероген-

ных аминов, как и у больных после операционного удаления опухоли, в качестве профилактики рецидивов (32). Lewis считает, что увеличение активности β -ГР в моче больных с раком мочевого пузыря заключается не в увеличении активности на единицу объема мочи, а в отношении к суточному количеству мочи, так как эти больные обычно выделяют большее количество мочи (110). Значительное увеличение активности β -ГР описано у больных раком молочной железы (193). Goldbarg и сотрудники (67) обнаружили нормальную активность этого фермента у больных с различными новообразованиями, а повышенная активность его в сыворотке имела место у больных раком головки поджелудочной железы. Увеличение активности β -ГР во влагалищном секторе свидетельствует о раке шейки матки (93). Фермент в этих случаях происходит непосредственно из опухолевой ткани, в которой отмечается высокая его активность. Повышенная активность β -ГР в спинномозговой жидкости описана у больных с *glioblastoma multiformae*, при доброкачественных же опухолях активность обычно была нормальной (8). Желудочный сок больных с опухолями желудка отличается более высокой активностью β -ГР, чем у больных с другими заболеваниями желудка (141).

ДРУГИЕ ФЕРМЕНТЫ

Только у небольшого количества больных раком поджелудочной железы отмечено увеличение активности амилазы в сыворотке. В этих случаях причиной увеличения активности вероятно является тот факт, что опухоль закупоривает выводные протоки железы. Увеличение активности амилазы описано также у больных опухолями легких (190), однако более поздние исследования не подтвердили этих данных (119).

Активность аспартат-аминотрансферазы остается нормальной у больных с различными формами лейкозов, даже при наличии лейкемических инфильтратов в печени (115). Активность трансаминаз остается нормальной также у больных с опухолями различной локализации (174), но часто повышается до значительной величины при появлении метастазов в печени (44, 203, 191).

У больных с опухолями часто имеет место уменьшение активности холинэстеразы в сыворотке. Это, как нам кажется, не является характерной чертой новообразований, а вероятно зависит от истощения и пониженного питания этих больных. Активность холинэстеразы резко уменьшается у больных с первичным и метастатическим раком печени (137, 194, 109, 130).

При новообразованиях печени отмечается увеличение активности лейцил-аминопептидазы сыворотки. Сообщения Goldberga и сотрудников о том, что исследование активности этого фермента имеет диагностическое значение при раке поджелудочной железы, не нашли подтверждения (129, 142). У 46% больных с опухолями описано увеличение активности лейциламинопептидазы в моче (68). Исследование этого фермента не имеет диагностического значения при новообразованиях ротовой полости и области шеи (34). Приведенные исследования были произведены с применением в качестве субстрата L-лейцил- β -нафтиламида. Увеличение активности этого фермента у больных с первичными метастатическими опухолями печени описано также при применении в качестве субстрата L-лейцил-глицина (64).

У больных раком (в 5 случаях из 8 обследованных) отмечено уменьшение муколитической (гиалуронат-лиаза) активности плазмы, приблизительно соответствующее злокачественности или распространенности патологического процесса (149).

При раке желудка обычно отмечается уменьшение активности уропепсिनогена в моче (12, 70), что, согласно некоторым авторам, может иметь диффе-

Увеличение активности β -ГР в моче больных с раком мочевого пузыря

Увеличение активности β -ГР в моче больных с раком мочевого пузыря

1. Albert J. Nat. Canc. 25, 461. — 4
2. 1, 640. — 6.
3. Allard C., J. Cancer; 1952
4. Auerbach
5. Baker 1954, 6, 13. —
6. E. D., Heck Res. 1952, 12
7. bour, Ontario 93. — 18. Bi
8. Hill B. R., R. Med. Wew
9. 21. Blanche
10. 22. Bodansky Tests 1950. B
11. Bodansky O., of Disease, N 1955, 8, 1087
12. Ass. 1957, 16
13. G. E., Shonk Brit. J. Canc
14. 31. Boylan
15. Wallace D. A Preuss. Akad 1959, 37, 231
16. 327, 523. —
17. Res. 1952, 12
18. Lowenstein J. 41. Calva I
19. Biochem. Bio sky M., Sher

ренциально-диагностическое значение при раке желудка и язвенной болезни. Некоторые авторы считают, что исследование активности уропепсина в желудочно-кишечного тракта при трудностях в установлении этиологии кровотечения. В этих случаях увеличение активности уропепсина в моче свидетельствует о кровотечении из язвы желудка или двенадцатиперстной кишки (70, 150). В отдельных случаях имеются сообщения об увеличении активности рибозофосфатизомеразы у больных с лимфогрануломатозом и лимфосаркомой (36).

Увеличение активности рибонуклеазы в моче описано при хронических миелоидных лейкозах, а активность ее в сыворотке в этих случаях остается нормальной (5,6). В сыворотке существует ингибитор трипсина, уровень которого, как нам кажется, увеличен у большинства больных с новообразованиями и уменьшается после хирургического удаления опухоли (140, 175). Однако изменения концентрации этого ингибитора не всегда однозначны, и поэтому не могут иметь диагностического значения (163). У больных с новообразованиями описано также увеличение количества ингибитора химотрипсина (45, 46, 47). Реасок и сотрудники (140) считают, что ингибитор химотрипсина, а также трипсина не обнаруживают постоянного повышения при новообразованиях. Повышение уровня ингибитора трипсина обнаружено у 60% больных, а уровня ингибитора химотрипсина у 36% больных с новообразованиями. Такой же взгляд относительно ингибитора химотрипсина в сыворотке высказывают Livingstone и сотрудники (111).

ЛИТЕРАТУРА

1. Albert Z., Orłowski M.: J. Nat. Cancer Inst., 1960, 25, 443. — 2. Albert Z., Orłowski M.: J. Nat. Cancer Inst., 1960, 25, 455. — 3. Albert Z., Orłowski M.: J. Nat. Cancer Inst., 1960, 25, 461. — 4. Albert Z.: Pol. Tyg. Lek., 1954, 9, 1565. — 5. Aleksandrowicz J.: Lancet; 1958, 1, 640. — 6. Aleksandrowicz J., Urbanczyk J., Ostrowska A., Sierko J.: Blood; 1958, 13, 652. — 7. Allard C., De Lamirande G., Cantero A.: Cancer Res., 1957, 17, 862. — 8. Anlyan A. J., Starr A.: Cancer; 1952, 5, 578. — 9. Ashmore J., Weber G., Landau B. R.: Cancer Res. 1958, 18, 974. — 10. Auerbach V. H., Waisman H. A.: Cancer Res. 1958, 18, 543. — 11. Baker R., Govan D.: Cancer Res. 1953, 13, 141. — 12. Balfour D. C.: Adv. Int. Med. 1954, 6, 13. — 13. Balis M. E. и соавт.: Cancer Res. 1955, 15, 673, 1956, 16, 628. — 14. Bayrd E. D., Heck F. J.: J. Am. Med. Ass. 1947, 133, 147. — 15. Beck W. S., Valentine W. N.: Cancer Res. 1952, 12, 823. — 16. Begg R. W.: Proc. Can. Cancer Research Conf., 1st Conf. Honey Harbour, Ontario, 1954, 237. — 17. Begg R. W., Lotz F.: Proc. Am. Ass. Cancer. Res., 1956, 2, 93. — 18. Bingold K., Stich W., Cramer H.: Z. Krebsforsch. 1951, 57, 653. — 19. Bierman H. R., Hill B. R., Reinhardt L., Emory E.: Cancer Res. 1957, 17, 660. — 20. Bladergroen W.: Pol. Arch. Med. Wewn. 1957, 27, 113. — 21. Blanchaer M. C., Green P. T., McClean J. P., Hollenberg M. J.: Blood; 1958, 13, 245. — 22. Bodansky O.: Cancer; 1957, 10, 865. — 23. Bodansky O.: Proc. First Conf. on Cancer Diagn. Tests 1950. Publ. Health Serv. Publ. No 96. Washington. U. S. Govern. Print. Office. 1951. — 24. Bodansky O., Scholler J.: Cancer Res., 1956, 16, 894. — 25. Bodansky O.: Cancer 1954, 7, 1200; of Disease, New York, The Macmillan Company 1952. — 26. Bodansky O.: J. Am. Med. Ass. 1955, 8, 1087. — 27. Bonner C. D., Homburger F., Smithy G. B., Borges P. R. F.: J. Am. Med. Ass. 1957, 164, 1070. — 28. Boxer G. E., Devlin T. M.: Science; 1961, 134, 1495. — 29. Boxer G. E., Shonk C. E.: Cancer Res. 1960, 20, 85. — 30. Boyland E., Wallace D. M., Williams D. C.: Brit. J. Cancer 1955, 9, 62. — 31. Boyland E., Gasson J. E., Williams D. C.: Brit. J. Cancer 1957, 11, 120. — 32. Boyland E., Wallace D. M., Williams D. C.: Brit. J. Cancer 1957, 11, 578. — 33. Brahn B.: Sitzber. Kgl. Preuss. Akad. Wiss., 1916, 20, 478. — 34. Braun-Falco O., Salfeld K., Braun-Falco: Klin. Wchsrf. 1959, 37, 231. — 35. Brdicka R.: Nature; 1937, 139, 1020. — 36. Bruns F. H.: Biochem. Z. 1956, 327, 523. — 37. Burk D.: Klin. Wchsrf. 1957, 35, 1102. — 38. Busch H., Potter V. R.: Cancer Res. 1952, 12, 660; 1953, 13, 168. — 39. Busch H.: Cancer Res. 1953, 13, 789. — 40. Calva E., Lowenstein J. M., Cohen Ph. P.: Cancer Res. 1959, 19, 101. — 41. Calva E., Cohen Ph. P.: Cancer Res. 1959, 19, 679. — 42. Carruthers C., Suntzeff V.: Arch. Biochem. Bioph., 1953, 45, 140. — 43. Chance B., Hess B.: Science; 1959, 129, 700. — 44. Chinsky M., Sherry S.: Arch. Int. Med., 1957, 99, 556. — 45. Clark D. G. C., Clifton E. E., Newton

- B. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1948, 69, 276. — 46. Clifton E. E.: J. Nat. Cancer Inst. 1950, 11, 33. — 47. Clifton E. E., Young L. E.: Cancer 1950, 3, 488. — 48. Clowes G. H. A., Keltch A. K.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1951, 77, 369; 1952, 81, 356. — 49. Cori C. F., Cori G. T.: J. Biol. Chem. 1925, 64, 11. — 50. Cori C. F., Cori G. T.: J. Biol. Chem. 1925, 65, 397. — 51. Dahms H.: Klin. Wchsrf. 1952, 30, 830. — 52. Daniel D., Van Zyl J. J.: Lancet; 1952, 262, 998. — 53. De Torregrasa M. V.: Am. J. Med. Sci. 1959, 238, 552. — 54. Dickens F., Weilherbe H.: Cancer Res. 1943, 3, 73. — 55. Du Bois K. P., Potter V. R.: Cancer Res., 1942, 2, 290. — 56. Эйлина Н. В. и Сейц: Доклад Академии Наук СССР 1951, 77, 653. — 57. Elman R., Arneson N., Graham E. V.: Arch. Surg., 1929, 19, 943. — 58. Euler H. V.: Ark. Kemi Ser. B 1936, 12, 15. — 59. Euler H. V., M. Malmberg, Gunther G.: Z. Krebsforsch. 1937, 45, 427. — 60. Feigelson Ph., Ultmann J. E., Harris S., Dashman T.: Cancer Res. 1959, 19, 1230. — 61. Fishman W. H., Lerner F. A.: J. Biol. Chem. 1953, 200, 89. — 62. Fishman W. H., Dart R. M., Bonner C. D., Leadbetter W. F., Lerner F., Homburger F.: J. Clin. Invest., 1953, 32, 1034. — 63. Fishman W. H., Bonner C. D., Homburger F.: New England J. of Med. 1956, 255, 925. — 64. Fleischer G. A., Butt H. R., Huizenga K. A.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic 1957, 32, 410. — 65. Fransen C. C., McLean R.: Am. J. Cancer, 1935, 24, 299. — 66. Glock G. E., McLean P.: Biochem. J. 1954, 56, 171. — 67. Goldbarg J. A., Pineda E. P., Banks B. M., Rutenburg A. M.: Gastroenterology 1959, 36, 193. — 68. Goldbarg J. A., Rutenburg A. M.: Cancer; 1958, 11, 283. — 69. Goranson E. S., McBride J., Weber G.: Cancer Res. 1954, 14, 227. — 70. Gray S. J., Ramsey C. G., Reifstein R. W., Krakauer L. J.: Gastroenterology 1955, 29, 641. — 71. Greenberg D.: Cancer Res. 1955, 15, 421. — 72. Greene A. A., Haven F. L.: Cancer Res. 1957, 17, 613. — 73. Greenstein J. P., Andervont H. B.: J. Nat. Cancer Inst. 1943, 4, 283. — 74. Greenstein H. P., Andervont H. B.: J. Nat. Cancer Inst., 1942, 2, 589. — 75. Greenstein J. P., Jenrette W. V., Mider G. B., White J.: J. Nat. Cancer Inst. 1941, 1, 687; 1941, 2, 17. — 76. Greenstein J. P.: J. Nat. Cancer Inst., 1955, 15, 1603. — 77. Greenstein J. P., Werne J., Eschenbrenner A. B., Leuthardt F. M.: J. Nat. Cancer Inst. 1944, 5, 55. — 78. Greenstein J. P.: Cancer Res. 1956, 16, 641. — 79. Griffin A. C. и соавт.: Cancer 1950, 3, 316. — 80. Gutman E. B., Sproul E. E., Gutman A. B.: Am. J. Cancer; 1936, 28, 485. — 81. Gutman A. B., Tyson T. L., Gutman E. B.: Arch. Int. Med. 1936, 57, 379. — 82. Hadjiolov A. A., Dancheva K. J.: Nature; 1958, 181, 547. — 83. Hill B. R., Levi C.: Cancer Res., 1954, 14, 513. — 84. Hill J. H.: Am. J. Clin. Path. 1956, 26, 120. — 85. Hill B. R., Jordan R. T.: Cancer Res. 1960, 17, 144. — 86. Hosk E., Tessier R. N.: J. Urol. 1949, 63, 488. — 87. Holzer P., Glogner P., Sedlmayr G.: Biochem. Z., 1959, 330, 59. — 88. Hsieh K. M., Blumenthal H. T.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1956, 91, 626. — 89. Hsieh K. M., Suntzeff V., Cowdry E. V.: Cancer Res., 1956, 16, 237. — 90. Huggins C., Scott W. W., Hodges C. V.: J. Urol., 1941, 46, 997. — 91. Hyman G. A., Harvey J.: Am. J. Med. 1955, 19, 350. — 92. Kampschmidt, Adams M. E., McCoy T. A.: Cancer Res., 1959, 19, 236. — 93. Kasdon S. C., Fishman W. H., Homburger F.: J. Am. Med. Ass. 1950, 144, 892. — 94. Kelly L. S., Jones H. B.: Science 1950, 111, 333. — 95. Kensler C. J., Sugiura K., Rhoads C. P.: Science 1940, 91, 623. — 96. Kielley R. K.: Cancer Res. 1952, 12, 124. — 97. Kidd J. G., Winzler R. J., Burk D.: Cancer Res. 1944, 4, 547. — 98. Kit S., Griffin A. C.: Cancer Res. 1958, 18, 621. — 99. Kotlarek-Haus S.: Pol. Tyg. Lek., 1962, 17. — 100. Kotlarek-Haus S.: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 541. — 101. Kosaki I., Ikoda T., Katani Y., Nakagawa S., Saka T. A.: Science 1958, 127, 1176. — 102. Kogl F., Erxleben H., Klein A. J., Van Veersen G. J.: Rec. trav. chim. 1950, 69, 822, 834. — 103. De Lamirande G., Allard C., Cantero A.: Cancer Res. 1958, 18, 952. — 104. Lehninger A. L.: J. Biol. Chem. 1951, 190, 345. — 105. Le Page G. A.: Cancer Res., 1948, 8, 197. — 106. Le Page G. A., Schneider W. C.: J. Biol. Chem. 1948, 176, 1024. — 107. Le Page G. A.: Cancer Res. 1950, 10, 77. — 108. Letnansky K., Seelich F.: Klin. Wchsrf. 1958, 36, 826. — 109. Levine M. G., Hoyt R. E.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1949, 70, 50. — 110. Lewis F. J. W., Plaice C. H. J.: Brit. J. Cancer 1960, 14, 106. — 111. Livingstone S. F., Silverman I., Sobel A. E.: Cancer Res. 1957, 17, 857. — 112. London M., McHugh R., Hudson P. B.: Cancer Res. 1954, 14, 718. — 113. Luhrs W., Negelein E.: Klin. Wchsrf. 1956, 34, 148. — 114. Lubbers P.: Klin. Wchsrf. 1957, 35, 590. — 115. Magill G. B., Wróblewski F., La Due J. S.: Blood; 1959, 14, 870. — 116. Mann W., Gruschow J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1949, 71, 658. — 117. Manso C., Sugiura K., Wróblewski F.: Cancer Res. 1958, 18, 682. — 118. McEuen C. S., Selye H.: Am. J. Med. Sci. 1935, 189, 423. — 119. McGeaching R. L., Adams M. P.: Cancer 1957, 10, 497. — 120. Medes G., Paden G., Weinhouse S.: Cancer Res. 1957, 17, 127. — 121. Medes G., Friedmann B. B., Weinhouse S.: Cancer Res. 1956, 16, 57. — 122. Meister A.: J. Nat. Cancer Inst. 1950, 10, 1263. — 123. Mendelsohn M. L., Bodansky O.: Cancer; 1952, 5, 1. — 124. Meyer K. A., Rosi P. A., Ragins A. B.: Surgery 1939, 6, 190. — 125. Merten R., Solbach H. G.: Klin. Wchsrf. 1961, 39, 222. — 126. Mędraś K.: J. Nat. Cancer Inst. 1960, 25, 465. — 127. Mider G. B., Tesluk H., Morton J. J.: Acta Union intern. Contre Cancer; 1948, 6, 409. — 128. Miller J. A.: Cancer Res., 1950, 10, 65. — 129. Miller A. L., Worsley L.: Brit. Med. J. 1960, 1419. — 130. Molander D. V., Friedman M. M., La Due J. S.: Ann. Int. Med. 1954, 41, 1139.

131. Nakagawa S.: Proc. Japan Acad. 1956, 32, 298. — 132. Nakahara W., Fukuoka F.: Japan. Med. J. 1948, 1, 271. — 133. Negelein E.: Biochem. Z. 1952, 323, 214. — 134. Negelein E.: Biochem. Z. 1925, 165, 122. — 135. Novikoff A. B., Potter V. R., Le Page G. A.: Cancer Res. 1948, 8, 203. — 136. Ono T., Sugimura T., Umeda M.: Gann. 1956, 48, 91. — 137. Orłowski M., Kotlarek-Haus S.: Pol. Tyg. Lek. 1958, 707, 13. — 138. Orr J. W., Strickland L. H.: Biochem., J. 1941, 35, 479. — 139. Payne A. H., Kelly L. S., White M. R.: Cancer Res. 1952, 12, 65. — 140. Peacock A. C., Scheehy J. J.: J. Nat. Cancer Inst. 1952, 12, 861. — 141. Pico C., Buccellato C.: Ann. ital. chir. 1956, 33, 479. — 142. Pineda E. P., Goldbarg J. A., Banks B. M., Rutenburg A. M.: Gastroenterology 1960, 33, 698. — 143. Pollack M. A., Taylor A., Taylor J., Williams R. J.: Cancer Res. 1942, 2, 739. — 144. Pollack M. A., Taylor A., Woods A., Thompson R. S., Williams R. J.: Cancer Res. 1942, 2, 748. — 145. Potter V. R.: Cancer Res. 1951, 11, 565. — 146. Quastel J. H., Zatman L. J.: Biochim. Bioph. Acta 1953, 10, 256. — 147. Rafalowicz A., Jabłońska M., Migdalska B., Muller J., Wolańska A.: Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 1285, Nowotwory 1960, 10, 105. — 148. Rafalowicz A., Jabłońska M., Wolańska A., Muller J.: Nowotwory 1960, 10, 113. — 149. Van Rey W., Finckh R.: Klin. Wchsrf. 1957, 35, 540. — 150. Rosensberg S. J.: Arch. Int. Med. 1957, 100, 937. — 151. Rosenthal O., Drabkin D. L.: Cancer Res. 1944, 4, 547. — 152. Ruffo A.: Bull. Soc. Chim. Biol. 1956, 39, 17. — 153. Sass J.: Aktywność dezaminazy adenozyiny w stanach fizjologii i patologii u dzieci. Praca doktorska. Wrocław 1961. — 154. Schack J.: J. Nat. Cancer Inst. 1943, 3, 389. — 155. Schade A. L.: Biochim. Bioph. Acta 1953, 12, 163. — 156. Schlamowitz M., Bodansky O.: J. Biol. Chem. 1959, 234, 1433. — 157. Schmidt C. G.: Klin. Wchsrf. 1955, 33, 409. — 158. Schneider W. C., Potter V. R.: Cancer; 1943, 3, 353. — 159. Shapiro D. M., Shils M. E., Dietrich L. S.: Cancer Res., 1953, 13, 703. — 160. Sibley J. A., Fleisher G. A.: Cancer Res. 1955, 15, 609. — 161. Sibley J. A., Lehninger A. L.: J. Nat. Cancer Inst. 1949, 9, 303. — 162. Sibley J. A., Fleisher G. A., Higgins G. M.: Cancer Res. 1955, 15, 306. — 163. Stanley P. G., Ramsey D. S.: Cancer Res. 1957, 17, 572. — 164. Straub F. B., Stephaneck O., Acher G.: Biochimia 1957, 22, 118. — 165. Sure B., Theis R. M., Harrelson R. T.: Am. J. Cancer 1939, 36, 252. — 166. Szczeklik E., Orłowski M., Łukasik S.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 941. — 167. Szczeklik E., Orłowski M., Szewczuk A.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 503. — 168. Szczeklik E., Orłowski M., Szewczuk A.: Gastroenterology 1961, 41, 353. — 169. Szewczuk A., Orłowski M.: Clin. Chim. Acta 1960, 5, 680. — 170. Taylor A., Pollack M. A., Hofer M. J., Williams R. J.: Cancer Res. 1942, 2, 744. — 171. Taylor A., Pollack M. A., Hofer M. Y., Williams R. J.: Cancer Res. 1942, 2, 752. — 172. Tschudy D. P., Collins A.: Cancer Res., 1957, 17, 976. — 173. Tyner E. P., Heidelberger C., Le Page G. A.: Cancer Res. 1952, 12, 158. — 174. Waisman H. A., Monder C., Williams J. N.: Cancer Res. 1956, 16, 344. — 175. Waldvogel M. J., Schmidt L. H.: Cancer Res. 1950, 10, 371. — 176. Warburg O., Hiepler E.: Z. Naturforsch. 1952, 7b, 193. — 177. Warburg O., Christian W.: Biochem. Z. 1943, 314, 399. — 178. Warburg O.: Science; 1956, 123, 309. — 179. Warburg O.: Über den Stoffwechsel der Tumoren. Springer Verlag Berlin 1926. — 180. Warburg O. и соавт.: Arch. Biochem. Bioph. 1958, 78, 573. — 181. Warburg O.: Triangle 1956, 2, 202. — 182. Weber G., Cantero A.: Cancer Res. 1959, 19, 763. — 183. Weber G., Cantero A.: Cancer Res. 1955, 15, 679. — 184. Weber G., Cantero A.: Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1957, 2, 259. — 185. Weil-Malherbe H., Schade R.: Biochem. J. 1948, 43, 118. — 186. Weil-Malherbe H.: Biochem. J. 1938, 32, 2257. — 187. Weinhouse S.: Advances in Cancer Res. 1955, 3, 289. — 188. Weinhouse S., Allen A., Millington R. H.: Cancer Res. 1953, 13, 367. — 189. Wenner C. E., Weinhouse S.: Cancer Res. 1953, 13, 21. — 190. Weiss M. J., Edmondson H. A., Wertman M.: Am. J. Clin. Path. 1951, 21, 1057. — 191. West M., Zimmerman H. J.: Arch. Int. Med. 1958, 102, 103. — 192. White L. P.: J. Nat. Cancer Inst. 1958, 21, 641, 685. — 193. Whitaker B. L.: Brit. J. Cancer 1960, 14, 471. — 194. Williams H. M., La Motta V., Wetstone H. J.: Gastroenterology 1957, 33, 58. — 195. Williams-Ashman H. G.: Cancer Res. 1953, 13, 721. — 196. Williams-Ashman H. G., Kennedy E. P.: Cancer Res. 1952, 12, 415. — 197. Winzler R. J., Smyth J. M.: J. Clin. Invest. 1948, 27, 617. — 198. Woodard H. Q.: Cancer; 1956, 9, 352. — 199. Woodard H. Q.: J. Clin. Invest. 1936, 15, 193. — 200. Woodard H. Q., Twombly G. H., Coley B. L.: J. Clin. Invest. 1957, 234, 301. — 201. Wróblewski F.: Cancer; 1959, 12, 27. — 202. Wróblewski F.: Am. J. Med. Sci. 1957, 234, 301. — 203. Wróblewski F., La Due J. S.: Cancer; 1955, 8, 1155. — 204. Zamecnik P. C., Frantz I. D.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1949, 14, 199. — 205. Zimmerman H. J., Weistein H. G.: J. Lab. Clin. Med. 1956, 48, 607.

Учебники и рефераты

1. Enzymes in Health and Disease. Изд. Greenberg D. M., Harper H. A. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois 1960. Гл. 11-Sidney Weinhouse. Enzyme systems in tumor cells Гл. 12-Oscar Bodansky. Enzymes in tumor growth with special reference to serum enzymes in cancer.
2. Greenstein J. P. Biochemistry of Cancer. Academic Press 1954, New York.

3. Weinhouse S. Oxidative metabolism of neoplastic tissues. Adv. in Cancer Res. 1955, 3, 269.
4. Richterich R. Enzymopathologie. Springer Verlag. 1958.
5. Begg R. W. Tumor-Host Relations Adv. in Cancer Res. 1958, 5, 1.
6. Nakahara W., Fukuoka F.: The newer concept of cancer toxin. Adv. in Cancer Res.
7. Abderhalden R. Klinische Enzymologie. Georg Thieme Verlag 1958.

ДРУГИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

FRANCISZEK KOKOT

АЛЛЕРГИЯ

Ферментология в аллергии делает лишь первые шаги. Несмотря на большое количество неясных вопросов, все больше внимания обращается на биохимическую сторону аллергических явлений. Первые теории биохимической интерпретации этих заболеваний известны давно (8), однако соответствующее обоснование они нашли в ферментологических исследованиях последних лет (2, 6, 4, 7). В настоящее время считается, что в ранней стадии аллергической реакции аллерген освобождает протеолитический процесс, в результате которого образуется гистамин или другие субстанции, ответственные за проявление соответствующих симптомов аллергии. Однако механизм действия аллергена достаточно не изучен. Установлено, что освобождение гистамина обусловлено наличием свободных групп $-SH$ и $-NH_2$. Блокирование их тормозит проявление аллергических реакций (4). Возможно, что аллергические реакции могут являться также следствием расстройства катаболизма образующегося гистамина, в котором, как известно, играет роль ацетилирующий фермент, диаминооксидаза и фермент, метаболизирующий гистамин II.

О протеолитическом характере аллергических реакций свидетельствуют также эксперименты Nicolau и сотрудников (6), в которых авторы доказали очень близкое сходство между характером аллергической реакции, вызванной аллергеном, и реакцией, наблюдаемой после местного или общего применения трипсина.

Ферментативные изменения, происходящие в крови и тканевых жидкостях при аллергических заболеваниях, также мало изучены. Abderhalden вспоминает о значительном увеличении содержания мурамидазы в желудке у аллергиков, а также о росте активности амилазы крови во время приступа бронхиальной астмы (1). Chachaj и Kowal-Gierczak описывают падение активности холинэстеразы крови при приступе бронхиальной астмы (3). Colldahl (5) наблюдал рост активности SGPT, SGOT и орнитин-карбамоилтрансферазы у астматиков при одновременно нормальных величинах лактатдегидрогеназы и изоцитратдегидрогеназы, а также альдолазы.

Из вышесказанного вытекает, что в настоящее время ферментологические исследования при аллергии только начинаются. Их более близкое изучение позволит, возможно, лучше понять механизм патогенеза этих заболеваний и расширит наши терапевтические возможности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abderhalden R.: Klinische Enzymologie, G. Thieme Verlag. Stuttgart 1958. — 2. Arthur R. P., Shelly W. B.: J. Invest. Dermat. 1955, 25, 341. — 3. Chachaj W., Kowal-Gierczak B.: Pol. Tyg. Lek. 1961, 16, 421. — 4. Chakravarty N.: Acta physiol. Scand., 1960, 48, 146. — 5. Colldahl H.: Acta Med. Scand., 1960, 166, 399. — 6. Nicolau S. G., Badanoiu AL.: Presse médicale 1961, 69, 1161. — 7. Rudzki E.: Alergia PZWL, Warszawa 1960. — 8. Ungar G.: Int. Arch. Allergy 1947, 4, 258.

ФЕРМЕНТОЛОГИЯ В АКУШЕРСТВЕ

Беременность вызывает целый ряд биохимических изменений в организме матери, о биологической целесообразности которых мы знаем еще мало. На-
личных органах матери могут являться выражением ее адаптации к расту-
щему плоду, или же результатом проникания ферментов из плаценты и плода
в кровяное русло матери. Хотя в свете данных последних лет эта вто-
рая возможность кажется мало вероятной, по крайней мере при нормаль-
ной беременности, то при осложненной беременности она имеет свое
значение.

Остановимся по очереди на:

- а) ферментологии нормальной беременности;
- б) ферментологии осложненной беременности (с токсикозом беременных
или с заболеваниями других органов);
- в) изменениях различных ферментов в крови из пуповины.

ФЕРМЕНТОЛОГИЯ НОРМАЛЬНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

1. Окситоциназа. Факт инаktivирования окситоцина сывороткой бере-
менных известен больше 30 лет. Фермент, разлагающий окситоцин, назы-
ваемый окситоциназой, вероятно защищает плод от последствий действия
гипофизарного окситоцина. Окситоциназа вероятно является ферментом, вы-
деляемым плацентой. Она активируется двувалентными ионами различных
металлов. При электрофорезе белков сыворотки крови ее можно обнаружить
во фракции α_1 глобулинов. Согласно Turry и Nesvadba (4) окситоциназа
является отдельной, или смесью разных аминокептидаз, отщепляющих коль-
цевую аминокислоту окситоцина. Этот фермент проявляет сходное действие,
расщепляя целый ряд соединений β -нафтиламина с α -аминокислотами. Это
свойство было использовано для разработки биохимических методов опреде-
ления активности окситоциназы (18). Однако следует отметить, что в насто-
ящее время не существует никаких доказательств того, что ферментом, разла-
гающим перечисленные производные β -нафтиламина с аминокислотами, явля-
ется окситоциназа. Кроме того следует подчеркнуть, что кинетика окситоци-
назы вообще изучена очень мало (3, 4, 5). Начиная с первых недель бере-
менности, активность этого фермента постепенно увеличивается, достигая
своего максимума примерно на 4 месяце беременности. На этом уровне она
остается до родов, и даже несколько дней после родов (36, 37, 38, 39). Однако
уровень фермента обычно возвращается к нормальным величинам в первые
дни после родов. Согласно другим авторам (18), рост активности этого фер-
мента начинается на первом месяце беременности и достигает вершины перед
родами. Систематический контроль активности этого фермента позволяет, по
мнению этих авторов (18), точно определить срок родов. Однако следует
подчеркнуть, что в отличие от предыдущих авторов, пользовавшихся биоло-
гической методикой определения окситоциназы (36, 37, 38, 39), Klimek и со-
трудники (18) пользовались химической методикой.

Дальнейшие исследования Klimek и Orzechowska (18) показали рост актив-
ности этого фермента также при заболеваниях паренхимы печени. Наиболь-
шие количества этого фермента обнаружены у мужчин и небеременных жен-
щин (4, 18). Это снижает значение данного фермента как диагностического
теста беременности и стадии ее развития. Это заставило Klimek и сотрудников
ввести пробу на чувствительность окситоцина (17). Лишь одновременное
определение активности этого фермента в крови и теста чувствительности на

окситоцин позволяют правильно оценить значение ферментологического исследования (18).

Факты обнаружения „окситоциназной“ активности у здоровых мужчин и небеременных женщин, как и при заболеваниях паренхимы печени при определении фермента химическими способами и отрицательные результаты при специфической биологической методике, могли бы свидетельствовать о существовании при беременности двух разных протеолитических ферментов. При угрожающем аборте активность окситоциназы в крови падает.

Протеиназы. Появление протеиназ в крови беременных женщин было обнаружено в начале нашего века (1). Их определение явилось первым химическим тестом беременности. Однако на пути распространения этой методики диагностики беременности стояли большие методические трудности. По мнению Abderhalden (1) появление протеиназ должно было бы являться защитной реакцией со стороны организма матери на проникающие в ее кровяное русло белковые тела из плаценты и плода. Эти белковые тела расщепляются под влиянием указанных ферментов. До сих пор не выяснено, имеется ли связь между протеиназами, обнаруженными Е. Abderhalden и описанной выше окситоциназой. В послеродовом периоде протеолитическая активность сыворотки крови усиливается (11).

Система свертывания крови и фибринолиза. Кровотечения, связанные с родами, составляют наибольший процент причин летальных случаев при родах. Относительная частота этого тяжелого осложнения явилась стимулом к тщательному изучению как системы свертывания, так и фибринолитической системы у беременных. При нормальной беременности время свертывания крови и длительность кровотечения остаются нормальными (42). Также уровень фибриногена (41), фактора V (44) и VII (43), и уровень протромбина (43), не обнаружили знаменательных отклонений от нормы. Непосредственно после выделения последа время свертывания крови уменьшается (42). Это наблюдение объясняет частые тромбозы после родов.

Данные о фибринолитической системе при беременности неоднородны. Если одни авторы (22) обнаружили падение фибринолитической активности по мере развития беременности, то другие (9, 42) этого не подтвердили. В послеродовом периоде фибринолитическая активность крови падает (29), не изменяется существенным образом (42), или увеличивается (20, 30). Такие различные данные вероятно обусловлены различием методов, которыми пользовались разные авторы. Методы, применяемые для исследования фибринолитической системы, очень часто не охватывают всех факторов, играющих определенную роль в процессе фибринолиза, поэтому и результаты, полученные отдельными авторами, трудно сравнивать.

Гидролазы. Среди гидролаз у беременных лучше всего изучена щелочная фосфатаза. По мере развития беременности активность этого фермента в крови увеличивается, достигая максимума на 8—10 месяце (14, 25, 26, 27, 46). В послеродовом периоде, после временного падения, активность фермента снова увеличивается, а именно тогда, когда увеличивается лактация. Этиология роста активности этого фермента при нормальной беременности не выяснена. Предполагается, что источником его является матка, плацента, надпочечники (в результате гиперфункции коры надпочечников) и костная ткань (в результате физиологической деминерализации костей).

Другим, относительно хорошо изученным у беременных гидролитическим ферментом, является неспецифическая холинэстераза. Большинство авторов отмечало нормальную или же максимально сниженную активность холинэстеразы по мере развития беременности (6, 21, 27, 46). Среди остальных гидролаз, исследованных при беременности, следует назвать амилазу и липазу.

При нормальной беременности активность этих ферментов не изменяется (1, 33).

Трансаминазы. При нормальной беременности активность SGOT и SGPT остается нормальной (6, 15, 16, 19, 20, 21, 24, 27, 33, 34, 45). Только в очень немногих случаях активность этих ферментов увеличивается без видимой причины (24). Во время родов иногда наблюдается кратковременный рост активности этих ферментов в крови, с быстрым падением до нормы в послеродовом периоде. Перинеотомия может повлечь за собой рост активности трансаминаз в крови (15, 16, 19).

Альдолаза в сыворотке крови остается нормальной как во время беременности, так и во время родов и в послеродовом периоде (27, 33).

Лактатдегидрогеназа. Результаты исследования активности этого фермента во время беременности различны у разных авторов. Если некоторые авторы (33) установили рост активности этого фермента по мере развития беременности, то другие авторы, а их большинство (12, 21, 23, 27, 45), не отмечают отклонения от нормы. Во время родов и непосредственно после родов отмечается кратковременное увеличение активности этого фермента (10, 23, 45).

Другие ферменты. Среди ферментов, активность которых в крови определяли во время беременности, следует назвать изоцитратдегидрогеназу, церулоплазмин, β -глюкуронидазу, каталазу и карбоангидразу. При нормальной беременности активность изоцитратдегидрогеназы в крови остается в норме (8). Постоянный рост активности этого фермента может свидетельствовать о существовании некротических изменений в плаценте, если исключить заболевания печени (7). Уровень церулоплазмينا увеличивается особенно в последней трети нормальной беременности (28, 35). Такой же рост активности в этом периоде обнаруживает β -глюкуронидаза (1). Активность этого фермента возвращается к норме уже в первые дни после родов. Активность каталазы и карбоангидразы при беременности не изменяется (33).

Наконец, следует указать на усиленное выделение уропепсина с мочой у беременных (40). Усиленное выделение этого фермента вероятно является результатом увеличения активности коры надпочечников, которое наблюдается во время беременности.

ФЕРМЕНТОЛОГИЯ ОСЛОЖНЕННОЙ БЕРЕМЕННОСТИ

Система свертывания крови и фибринолиза. Особенно опасными по последствиям являются состояния несвертываемости крови, чаще всего встречающиеся в периоде родов. Согласно мнению большинства авторов они могут являться:

а) результатом проникновения тромбопластических субстанций из плаценты в кровяное русло матери, что в свою очередь приводит к афибриногенемии, или

б) результатом освобождения в кровяное русло матери активатора плазминогена из плацентарных тканей и матки. В результате образуется плазмин, разлагающий фибриноген на молекулы, не подвергающиеся уже больше полимеризации (13, 31, 32).

Возможно также проявление обоих процессов одновременно. Характерной чертой этих состояний несвертываемости является то, что они появляются совершенно неожиданно и их никогда не удастся предвидеть. Даже при не медленном применении фибриногена или ϵ -аминокапроновой кислоты — очень сильного ингибитора активаторов плазминогена и самого плазмина — не всегда удастся добиться желаемого результата.

Гидролазы. При тяжелых токсикозах беременности часто наблюдается падение активности амилазы и холинэстеразы (6,21), а также рост активности щелочной фосфатазы (2).

Трансаминазы. В определенном проценте случаев токсикозов беременности увеличивается активность SGOT и SGPT (6, 16, 20, 21). Не отмечается никакой взаимозависимости между ростом активности этих ферментов и интенсивностью альбуминурии, кровяным давлением, величиной отеков, неврологическими симптомами и печеночными пробами (6, 21). Поэтому определение активности трансаминаз не позволяет ни оценить тяжести патологического процесса, ни предвидеть его течения.

Смерть плода обычно не приводит к изменениям активности трансаминаз у матери (19, 34), или дает лишь незначительное увеличение их (33). Поражение печеночной паренхимы, очаговый некроз сердечной мышцы или распространенная атрофия мышц, появляющаяся во время беременности, увеличивают активность этих ферментов в крови матери (смотри ферментология этих органов).

Другие ферменты. При токсикозе беременности в определенном проценте случаев наблюдается рост активности изоцитратдегидрогеназы (7, 8), лактатдегидрогеназы (6, 24, 33), глюкозофосфатизомеразы и альдолазы (2). Не отмечалось изменения активности каталазы и карбоангидразы (33). Некоторые авторы отмечали также рост активности β -глокуронидазы (1, 33), а также большее, чем при нормальной беременности, выделение с мочой уропепсина (40), альдолазы, глюкозофосфатизомеразы, щелочной фосфатазы и SGPT (2).

В настоящее время мы еще точно не знаем причины увеличения, в определенном проценте случаев, активности некоторых ферментов в крови матери при беременности, осложненной токсикозом. Однако, как нам кажется, не подлежит сомнению, что по крайней мере у некоторых больных этот рост вызван поражением печеночной паренхимы. Если источник патологической активности таких ферментов, как SGOT, SGPT, лактатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа, а также холинэстераза, находится в печени, то следует принять, что существуют токсикозы беременности, протекающие с повреждением этого органа или без повреждения его. Однако с другой стороны отсутствие корреляции между активностью этих ферментов в плазме крови и функциональными пробами печени, а также тяжестью клинической картины токсикоза и быстрая нормализация активности их в послеродовом периоде, заставляют предполагать, что определенное значение во всем этом имеют и другие органы и особенно плацента и плод. Следует добавить, что нормальные или патологические величины выше перечисленных ферментов при токсикозе беременных не позволяет оценивать тяжесть патологического процесса и предвидеть его течение.

РАЗЛИЧНЫЕ ФЕРМЕНТЫ В ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Долголетний спор о возможности обмена ферментами между матерью и плодом до сих пор окончательно не разрешен, тем не менее, однако, исследования последних лет все больше подтверждают взгляд, что при нормальной беременности ферментный спектр крови плода является исключительно обособленным. Произведенные одновременно определения активности некоторых ферментов в пуповинной крови и крови матери показали полное отсутствие какой бы то ни было корреляции как при нормальной беременности (6, 21, 27), так и при беременности, осложненной токсикозом (6, 21). Совершенно непонятными являются патологические величины отдельных ферментов у совершенно здоровых и доношенных плодов, что встречается в определенном

1. Abderhalden E.: Zespolowe badania krwi i moczu. Doniesienia z 1959, 20, 174. — Schnitz H.: Geb. u. Gyn. 1961, 32, II, 827. — 8. 1961, 68, 264. 1957. — 10. Fy. 11. Goisis M. 12. Gyna A. P.: Am. J. 241. — 14. Klee. 11, 278. — 16. 1961, 16, 1309. Klimek R., Wiszn. Przegl. Lek. 1957, 21. Kokot F., Gyn. 1957, 19. Arch. f. Gynäk., 20. Kudla T., W. Taylor T. H.: J. Cartwright G. E. Lovotti A.: Ri. 683. 31. Niesert H. G. Jr., Taylor M. Geburtshilfe, VB. 1957, 15, 201. — 37. Se. Setela M.: Oxytocinasa v tehotens. Koskinen P.: Acta Pol. 1960, 31, 1. Smek J., Waronsh. M., Sieron G., Sn. H. J.: Am. J. Med. Temant R., Whit. 2. — Клиническая

числе случаев. Еще остается выяснить, в какой степени обнаруживаемые патологические величины зависят от так называемой „тканевой незрелости“ плода, или от определенных повреждений тканей, не определяющихся клинически.

Ферментный состав пуповинной крови доношенного ребенка несколько отличается от состава крови матери. Так, в пуповинной крови активность амилазы ничтожна в сравнении с кровью матери (33). Также активность церулоплазмينا (35) и β -глюкуронидазы в пуповинной крови является значительно меньшей, чем в крови матери. К группе ферментов, отличающихся меньшей активностью в пуповинной крови, относятся также холинэстераза (6, 27) и щелочная фосфатаза (27). Не обнаружено заметной разницы между средней активностью SGOT, SGPT (6, 21, 27, 45) и липазой (27 и цитировано по 33) в крови матери и плода.

Наконец, следует отметить умеренное или отчетливое увеличение уровня (10, 27, 45) лактатдегидрогеназы и альдолазы в пуповинной крови. Отличие активности некоторых ферментов в пуповинной крови, от активности их в крови матери вероятно отражают приспособление плода к специфическим условиям существования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abderhalden R.: Klinische Enzymologie, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1958. — 2. Baraban H.: Zespołowe badania enzymów w chorobach nerek z uwzględnieniem aktywności w surowicy krwi i moczu. Doniesienie III. Późne zatrucia ciążowe. — 3. Beller F. K., Göbelsmann U.: Bibl. gynaec. 1959, 20, 174. — 4. Beller F. K., Göbelsmann U.: Acta Endocrinol., 1959, 31, 467. — 5. Beller F. K., Schnitz H.: Geburtshilfe u. Frauenheilkunde, 1960, 20, 563. — 6. Cekański A., Kokot F.: Ginek. Polska 1961, 32, 565. — 7. Dawkins M. J. R., McGregor W. G., McLeah A. E. M.: Lancet, 1959, II, 827. — 8. Dawkins M. J. R., Wigglesworth J. S.: J. Obst. Gynec. Brit. Commonwealth, 1961, 68, 264. — 9. Elsner P.: Fibrinolyse in Schwangerschaft und Geburt, Karger S., Basel, 1957. — 10. Fylling P.: Scand. J. Clin. Lab. Investig., 1961, 13, 264. — 11. Goisis M., Candotti G.: Ann. Ostetr. Ginec., 1955, 77, 1022. — 12. Heimback D. P., Prezyrna A. P.: Am. J. Obst. Gynec. 1960, 79, 108. — 13. Held E.: Schw. Med. Woch., 1956, 86, 241. — 14. Klees E., Frenzel G.: Klin. Woch. 1960, 38, 340. — 15. Klimek R.: Przegl. Lek. 1958, 11, 278. — 16. Klimek R.: Канд. диссер. — 17. Klimek R., Madej J., Pietrzycka M.: PTL 1961, 16, 1309. — 18. Klimek R., Pietrzycka M.: Clinica Chimica Acta 1961, 6, 326. — 19. Klimek R., Wiszniewska E., Zamello J.: Ginek. Polska 1959, 30, 345. — 20. Kokot F., Cekański A.: Przegl. Lek. 1959, 15, 291. — 21. Kokot F., Cekański A.: Ginek. Polska 1958, 29, 131. — 22. Kotasek A., Kuzel D.: Ces. Gynecologie, 1959, 38, 265. — 23. Kubli F.: Arch. f. Gynäk., 1961, 194, 406. — 24. Kubli F.: Arch. f. Gynäk., 1961, 194, 413. — 25. Kudła T., Waroński W.: Ginek. Polska 1959, 30, 563. — 26. Kudła T., Waroński W.: Ginek. Polska 1960, 31, 179. — 27. Lapan B., Friedman M. M., Taylor T. H.: J. Lab. Clin. Med. 1959, 54, 417. — 28. Markowitz H., Gubler C. J., Mahoney J. P., Cartwright G. E., Wintrobe M. M.: J. Clin. Investig., 1955, 34, 1498. — 29. Mazzetti G. M., Lovotti A.: Riv. Ostetr., 1958, 38, 757. — 30. Niesert H. W.: Zbl. Gynäk., 1956, 78, 683. — 31. Niesert H. W., Bachman F.: Zbl. Gynäk., 1956, 78, 648. — 32. Philips L. L., Montgomery G. Jr., Taylor H. C.: Am. J. Obst. Gynec., 1957, 73, 43. — 33. Rimbach E.: Enzymologie der Geburtshilfe, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1960. — 34. Samochowiec L., Wawryk R., Samochowiec E.: Pol. Tyg. Lek. 1959, 14, 1053. — 35. Scheinberg H., Cook C. D., Murphy J. A.: J. Clin. Investig. 1954, 33, 963. — 36. Sevela M., Skacel K.: Act. Univ. Polak. Oloumcensis 1958, 15, 201. — 37. Sevela M., Skacel K.: Acta Univ. Polak. Oloumcensis, 1959, 16, 96. — 38. Skacel K., Sevela M.: Oxytocinasa v tehotenstvi, Cs. fysiolo 1959, 8, 23. — 39. Skacel K., Sevela M.: Oxytocinasa v tehotenstvi, Acta Univ. Polak. Oloumcensis, 1959, 16, 92. — 40. Soiva K., Castren O., Koskinen P.: Acta Endocrinol., 1958, 27, 123. — 41. Starzewski W., Glowinski M., Musiolik M., Sieron G., Smok J., Waroński W.: Ginek. Polska 1960, 31, 359. — 42. Starzewski W., Glowinski M., Musiolik M., Sieron G., Smok J., Waroński W.: Ginek. Polska 1960, 31, 579. — 43. Starzewski W., Glowinski M., Musiolik M., Sieron G., Smok J., Waroński W.: Ginek. Polska 1960, 31, 661. — 44. Starzewski W., Glowinski M., Musiolik M., Sieron G., Smok J., Waroński W.: Ginek. Polska 1960, 31, 669. — 45. West M., Zimmerman H. J.: Am. J. Med. Scienc., 1958, 235, 443. — 46. Wetstone H. J., McMotta R. V., Middlebrook L., Tennant R., White B. V.: Am. J. Obst. Gynec., 1958, 76, 480.

ВРОЖДЕННЫЕ ФЕРМЕНТОПАТИИ

KAZIMIERZ SPETT

Начало современным взглядам на механизм и патогенез расстройств метаболизма, обусловленным генетическими факторами, положено трудами Garrod (40, 41, 58), который в начале нашего века дал определение четырем известным в то время расстройствам этого типа (алкаптонурии, альбинизму, цистинурии и пептозурии) как врожденным расстройствам метаболизма. В настоящее время к этой группе относят больше чем 30 различных заболеваний. Их общей чертой являются переносимые генетически расстройства функции некоторых ферментов. Эти расстройства могут заключаться в: 1) полном или частичном отсутствии ферментной активности; 2) чрезмерном усилении ферментных функций; 3) продукции патологических ферментов, то есть таких, которые не встречаются в здоровом организме.

Причиной расстройств первой группы, в которую входит большинство врожденных ферментопатий, прежде всего являются мутации, приводящие к выпадению матрицы нуклеиновых кислот, ответственной за синтез данного апофермента. Однако здесь может иметь место и генетически обусловленное расстройство соотношения естественных активаторов и ингибиторов.

Также и чрезмерная ферментная активность, появляющаяся при гиперфункции и порфириях, не обязательно связана с повышенной продукцией апофермента. Она может быть обусловлена выпадением ингибитора, что в результате приводит к гиперфункции фермента.

Третий тип расстройств обусловлен генетическим преобразованием матрицы нуклеиновых кислот, что влечет за собой продукцию ферментов, которые не встречаются в физиологических условиях. Для того, чтобы подчеркнуть значение этого механизма в этиологии определенных генетических заболеваний, вызванных синтезом нефизиологических белковых молекул, принят предложенный Pauling (68) термин „наследственные молекулярные болезни“. Классическими примерами метаболических заболеваний, относящихся к этой группе, являются серповидноклеточная анемия и другие анемии, вызванные продукцией разных форм гемоглобина, молекула которых построена иначе, чем молекула нормального гемоглобина.

С генетической точки зрения, большинство ферментопатий наследуется как рецессивный аутосомный признак. Доминирующий аутосомный ген является ответственным за проявление лишь нескольких заболеваний, а именно: почечной глюкозурии, вероятно гиперурикемии, а также некоторых типов порфирии и метгемоглобинемии. Передача при помощи рецессивного гена, сопряженного с хромосомой X, обуславливающей пол, до настоящего времени обнаружена для гемофилии и, вероятно, глицинурии.

Большинство врожденных пороков метаболизма проявляется появлением в моче субстанций, которые отсутствуют в нормальной моче, или присутствуют в следовых количествах. Расстройства этого типа можно разделить на две группы (45). В первой почечный порог отсутствует или является очень низким, в результате чего данная субстанция выделяется с мочой несмотря на нормальную концентрацию ее в крови, а иногда даже более низкую, чем нормальная. К этой группе относится почечная глюкозурия, ацидурия β -аминоизомасляной кислоты, классическая цистинурия и комплекс симптомов Фанкони у молодых и взрослых. С точки зрения генетики проявление этих расстройств может являться следствием аномалии генов, обуславливающих канальцевую реабсорбцию. Поскольку однако, канальцевой реабсорбцией управляет гормон задней доли гипофиза, гормоны коры надпочечников и других органов,

не исключена возможность, что патология почечных канальцев вызвана не аномалией генов, находящихся в ядрах их клеток, а патологией генов в коре надпочечников, гипофизе, подбугорье или клеточных ядрах какого-то другого органа, связанного с канальцевой реабсорбцией. Вообще можно считать, что гены этого типа обуславливают проницаемость некоторых оболочек, а заболевания, вытекающие из их аномалии, интерпретировать как блокаду оболочек, а не как блокаду метаболизма.

В другой группе заболеваний выделяемая субстанция не подвергается метаболизму в тканях в результате генетически обусловленного торможения фермента. Концентрация ее в крови увеличивается выше нормального уровня и почки выделяют ее таким же образом, как и почки нормального человека после перфузии кровью, содержащей высокие концентрации данного вещества. К этой группе расстройств относятся: фруктозурия, пентозурия, галактозурия и порфирии.

Abderhalden (1) приводит клиническую классификацию врожденных ферментопатий на основании изучения течения данного заболевания. Применение такого критерия позволяет выделить среди известных аномалий этого типа три группы:

1. Бессимптомные формы. У лиц с этой аномалией не отмечается никаких функциональных расстройств. Она также ничем не угрожает их жизни. Заболевание чаще всего обнаруживается случайно во время обычных лабораторных анализов. К этой группе относятся: фруктозурия, почечная глюкозурия и болезнь Gilbert.

2. Относительно бессимптомные формы. Аномалии этого типа в нормальных условиях также не дают никаких субъективных симптомов. Однако они приобретают клиническое значение когда организм окажется под воздействием определенных факторов. Так, например, врожденная гипоацетилхолинэстеразия проявляется лишь тогда, когда больные, страдающие этим заболеванием, получают лекарственные вещества, тормозящие ацетилхолинэстеразу. В этих случаях развивается тяжелое апное, которое может закончиться смертью. Особенно опасными для таких лиц являются инсектициды из группы ингибиторов ацетилхолинэстеразы. Следующим заболеванием, относящимся к этой группе, является так называемый хинолиновый гемолиз (24), встречающийся у 10% североамериканских негров и очень редко среди людей белой расы. Прием противмаларийного препарата 8-(4-амин-1-метилбутил-амин)-6-метоксихолина вызывает у этих больных внутрисосудистый гемолиз. Единственным ферментным дефектом, обнаруженным в этих случаях, является исчезновение в эритроцитах активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы. Этот фермент катализирует редукцию окисленного глутатиона по отношению к глюкозо-6-фосфату. Выпадение функции глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы влечет за собой снижение уровня редуцированного глутатиона в эритроцитах, но сам механизм появления гемолиза при этом расстройстве остается до настоящего времени неясным.

3. Клинические формы. Сюда относятся те врожденные ферментные пороки, которые проявляются явными клиническими симптомами. Типичными примерами таких заболеваний являются: фенилкетонурия, галактозурия, серповидноклеточная анемия, порфирии и тазаврозы. Клиническое течение этих ферментопатий очень тяжелое, а многие из них кончаются смертью.

Современная систематика врожденных ферментопатий заключается в группировании их согласно вида биохимического обмена, подвергающегося расстройству при дисфункции ответственного за это состояние фермента. Такой критерий позволяет выделять врожденные ферментные расстройства

обмена белков, углеводов, жиров, пуриновых соединений и так далее. Такая классификация с одной стороны отображает современное направление, придающее особое клиническое значение расстройствам промежуточного обмена, а с другой — подчеркивает, что первичным этиологическим фактором этих заболеваний являются генетически обусловленные биохимические различия.

БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН

РАССТРОЙСТВА ОБМЕНА ФЕНИЛАЛАНИНА И ТИРОЗИНА

Метаболизм фенилаланина и тирозина в здоровом организме идет в нескольких направлениях и конечные продукты обмена этих аминокислот представлены на рисунке 72.

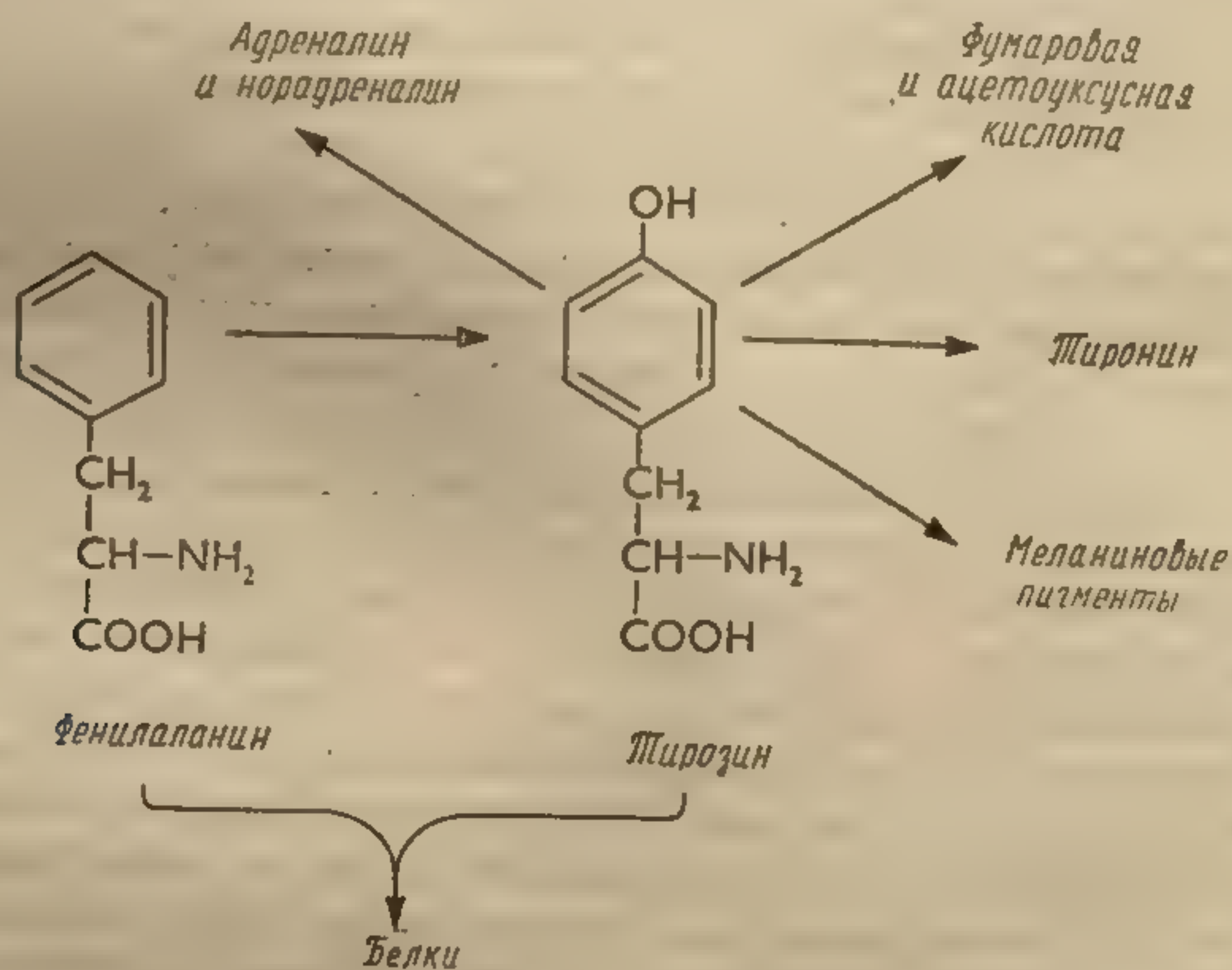


Рис. 72. Конечные продукты обмена фенилаланина и тирозина.

Метаболические блокады характера врожденной ферментопатии имеют место на следующих этапах обмена фенилаланина и тирозина:

- 1) окисления фенилаланина до тирозина с симптомами так называемой фенилкетонурии или фенилурии;
- 2) окисления тирозина до 2,5-дигидроксипровиноградной кислоты с появлением так называемой гидроксифенилурии или тирозиноза;
- 3) дальнейшего окисления тирозина до фумаровой и ацетиуксусной кислоты с появлением алкаптонурии;
- 4) синтеза меланиновых пигментов с появлением альбинизма;
- 5) синтеза белка при некоторых анемиях, гипотромбинемии и, вероятно, мышечной атрофии (61).

Труднее, чем перечисленные ферментопатии, определить частичное торможение образования тироксина из тирозина, чему в некоторых случаях сопутствует кретинизм. В обмене адреналина не обнаружено аналогичных расстройств, кроме возможного снижения уровня его при фенилкетонурии, вызванного отсутствием тирозина. Синтез гормонов мозгового слоя надпочечников вероятно является таким жизненно важным процессом, что возможные расстройства его приводят к смерти плода уже во внутриутробном периоде (61).

С клинической точки зрения наиболее важными ферментными расстройствами в обмене фенилаланина и тирозина являются: фенилкетонурия (фениллурия), гидроксифениллурия (тирозиноз), алкаптонурия и альбицизм. Механизм возникновения этих ферментопатий представлен на рисунке 73.

Фенилкетонурия (фениллурия) появляется в результате выпадения функции производства в печени гидроксилазы, специфически катализирующей реакцию окисления фенилаланина атмосферным кислородом при наличии НАДФ · Н₂ до тирозина и воды. Этот фермент зависит от двух генов, дефекты которых влекут за собой инактивацию его и фенилкетонурию. Дефектная форма только одного из этих генов вызывает заметное снижение активности фенилаланингидроксилазы (фенилаланин-4-гидроксилазы), однако дефицит этого фермента не дает никаких клинических симптомов. Не выяснено до сих пор, является ли отсутствие активности фермента результатом торможения его или полного отсутствия (61).

Ферментная блокада вызывает увеличение уровня фенилаланина в плазме, иногда в 30 раз превышающее физиологический уровень (норма = 1,4 мг%). Кроме фенилаланина накапливаются продукты дезаминирования и декарбоксилирования этой аминокислоты: фенилпиروвиноградная, фенилмолочная и фенилуксусная кислоты (53). Эти соединения фенола выделяются с мочой, причем фенилпиروвиноградная кислота резко преобладает над остальными, вероятно в результате избирательной проницаемости почечных канальцев по отношению к этой кетокислоте (65). Поэтому для определения выпадения функции фенилаланингидроксилазы (фенилаланин-4-гидроксилазы) чаще применяется термин фенилкетонурия, чем очень общий термин фениллурия.

Главным клиническим симптомом этого заболевания является психическое недоразвитие в 60—70% случаев типа идиотизма и в 22—33% имбецилизма. Необыкновенно редко встречаются больные на границе нормального уровня интеллигентности (9, 16, 26). Поэтому это заболевание вначале называлось *imbecilitas phenilopyruvica* (35), а затем *oligophrenia phenilopyruvica* (54). Этот термин еще и сейчас применяется довольно часто для того, чтобы подчеркнуть первостепенное клиническое значение психических изменений, черкнуть первостепенное клиническое значение психических изменений, сопутствующих фенилкетонурии. Торможение развития появляется у детей уже в конце первого года жизни, главным образом в виде позднего прорезывания зубов и статических расстройств, которые являются одним из главных клинических симптомов в первые годы жизни. Частой аномалией является торможение развития черепа с последующей микроцефалией, а также неврологические расстройства в виде экстрапирамидальных симптомов и даже судорог. Теоретически могут существовать два механизма, вызывающие психические расстройства при этом заболевании. Они появляются или в результате токсического действия накопившихся феноловых соединений на центральную нервную систему, или же в результате расстройства синтеза белков нервной ткани, вызванного дефицитом тирозина. Возможно, что оба механизма одновременно играют роль в этиологии этого патологического состояния нервной системы (1).

Следующими клиническими изменениями, имеющими место при фенилкетонурии, являются пигментные и кожные расстройства. Первые из них заключаются в неправильном образовании и распределении метаболитов в результате чего больные отличаются очень светлой окраской кожи, волос и глаз (радужных оболочек). Синтез меланиновых пигментов при фенилкетонурии затруднен скорее всего в результате торможения диоксифенилаланиноксидазы L-фенилаланином. О таком механизме торможения свидетельствует увеличение интенсивности пигментации при применении у больных диеты,

бедной фенилаланином (4, 8, 92). К кожным симптомам относятся главным образом кожные сыпи и мышиный запах пота.

Диета, бедная фенилаланином, приводит к нормализации выделения метаболитов этой кислоты с мочой, однако не оказывает практического влияния на существующие психические расстройства. Патологические изменения в центральной нервной системе, вызванные расстройствами метаболизма, вероятно необратимы. Определенную надежду можно возлагать на очень раннее диетическое лечение. Ограничение фенилаланина, получаемого с пищей, уже в первые недели жизни, предотвращает у леченных таким образом детей появление симптомов психического и соматического недоразвития (49, 50). В связи с этими ободряющими результатами чрезвычайно важным является ранняя диагностика фенилкетонурии, еще перед появлением отчетливых симптомов недоразвития. Наиболее важной лабораторной пробой, служащей для диагностики этого заболевания, является реакция Фолинга (35), которая заключается в том, что к подкисленной моче прибавляют несколько капель 5% раствора хлористого железа. В присутствии фенилпиروвиноградной кислоты возникает нестойкое оливково-зеленое окрашивание. Ввиду того, что выделение фенилпиروвиноградной кислоты может иметь периодический характер, следует в подозрительных случаях повторить анализ несколько раз, а в случае необходимости — после нагрузки 3 г фенилаланина (1). Диагноз подтверждает микробиологическое или хроматографическое определение фенилаланина в плазме.

Фенилкетонурия встречается с частотой примерно 1:25000 среди населения Европы и 1:100 у психически больных. Длительность жизни больных, страдающих этим заболеванием, значительно снижена, как и при всех состояниях психического недоразвития (59).

Гидроксифенилурия (тирозиноз) является результатом торможения функции п-гидроксифенил-пируват-гидроксилазы окисляющей п-гидроксифенилпиروвиноградную кислоту в присутствии аскорбиновой кислоты до 2,5-дигидроксипирувиноградной кислоты. Метаболическая блокада на этом уровне вызывает накопление и выделение с мочой п-гидроксифенилпирувиноградной кислоты, ее предшественника тирозина и метаболитов: п-гидроксифенилмолочной и п-гидроксифенилуксусной кислот. Эта патология в классической форме встречается значительно реже, чем фенилкетонурия, но сопутствует часто разным аномалиям, как преждевременные роды, дефицит аскорбиновой кислоты особенно при диете, богатой белками, дефицит фолиевой кислоты, некоторые случаи анемии и ревматизма, а также состояния печеночной недостаточности (34, 61). В большинстве этих случаев прием аскорбиновой кислоты снижает выделение гидроксифенильных соединений. Иногда эффективно действует также фолиевая кислота (74).

Алкаптонурия является одной из раньше всего изученных врожденных ферментопатий, и заключается в дефекте отдельного рецессивного аутосомного гена. Однако в редких случаях она вероятно может также наследоваться, как доминантный признак. Основным клиническим симптомом является выделение с мочой большого количества гомогентизиновой кислоты, нормального промежуточного метаболита в процессе превращения тирозина в фумаровую и ацетилуксусную кислоту. Эта кислота начинает выделяться через несколько дней после рождения и выделяется всю жизнь.

Гомогентизиновая кислота, соединение, обладающее сильными редуцирующими свойствами (редуцирует реактив Фелинга при комнатной температуре), накапливается в избыточном количестве и выделяется с мочой в результате выпадения функции гомогентизат-оксигеназы, фермента, обладающего свойствами железопротеида, не содержащего порфиринового ядра.

Он катализирует окисление гомогентизиновой кислоты с разрывом кольца и образованием энольной формы фумарилацетилауксусной кислоты. Механизм ферментного блока при этом заболевании до настоящего времени не выяснен. В щелочной среде гомогентизиновая кислота самопроизвольно окисляется атмосферным кислородом до хиноновых соединений, которые полимеризуют с образованием бурого или черного красителя, раньше называемого алкаптоном. Поэтому моча, содержащая гомогентизиновую кислоту, через некоторое время темнеет, а этот процесс можно ускорить, подщелачивая мочу.

Почки обычно не выделяют всей образующейся гомогентизиновой кислоты. Некоторое количество этого соединения отлагается в хрящах, апоневрозах, сухожилиях и склере, то есть в тканях с особенно медленным уровнем обмена. Накопившаяся в этих тканях гомогентизиновая кислота полимеризуется, как и в моче, образуя бурочерный пигмент. В результате этого наступает прижизненное окрашивание хрящей и родственных тканей, называемое охронозом. Это часто видно сквозь кожу, особенно в области хрящей носа и ушных хрящей. Отложения пигмента, накопившиеся в перечисленных выше тканях, могут привести к структурным изменениям, в результате чего появляются некротические очаги в области суставов (*arthropatia alcaptonurica*). Суставные симптомы обычно появляются в среднем возрасте (рентгеновская картина типична для *osteoarthritis deformans*) и могут приводить к инвалидности. Иногда алкаптонурии сопутствуют костные изменения в виде остеопороза. В этиологии этих последних играет роль деминерализация, наступающая ввиду увеличенного количества гомогентизиновой кислоты (21).

В механизме развития охроноза вероятно играет роль торможение гиалуронатлазы продуктами окисления гомогентизиновой кислоты, что приводит к замедлению обмена гиалуроновой и хондроитинсерной кислот. Торможение обмена мукополисахаридов влечет за собой замедление процессов диффузии, играющих важную роль в обмене веществ с низким уровнем метаболизма тканей. Такое состояние способствует отложению в них цветных полимеров гомогентизиновой кислоты. О таком механизме свидетельствуют наблюдения, касающиеся экзогенного охроноза, сопутствующего отравлениям соединениями фенола (44).

Другим осложнением, сопутствующим иногда алкаптонурии, является цианоз, вызванный метгемоглобинемией. Хиновая форма гомогентизиновой кислоты окисляет в этих случаях гемоглобин до метгемоглобина (гемиглобина). Лечение аскорбиновой кислотой обычно приводит к улучшению состояния.

Альбинизм заключается в расстройстве продукции меланиновых пигментов в меланоцитах. Клинически различают полный альбинизм, который наследуется как рецессивный признак, и частичный альбинизм, при котором ферментный дефект ограничивается только определенными частями кожи. Ферментная блокада при альбинизме находится в месте перехода 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) в соответствующий ортохинон. Этот окислительный процесс катализирует диоксифенилаланин-оксидаза (ДОФА-оксидаза), которая находится в митохондриях цитоплазмы меланоцитов как неактивный профермент. Этот фермент, как и ультрафиолетовые лучи, активизируются следовые количества 3,4- α -диоксифенилаланина (61). В органах альбиносов имеются амеланотические то есть лишенные пигмента меланоциты. В этих клетках не отмечается активности ДОФА-оксидазы. Солнечные ожоги и расстройства зрения в результате отсутствия защиты от световых лучей являются единственными клиническими осложнениями при альбинизме.

АМИНОАЦИДУРИИ

Термином аминокислотурия определяют выделение с мочой одного или нескольких свободных аминокислот в больших количествах, чем в нормальной моче (47, 67). Эта аномалия может сопутствовать многим приобретенным заболеваниям, а также встречается как врожденный порок метаболизма (67, 78). Среди врожденных аминокислотурий на первый план выдвигаются те, при которых расстройства обмена или выделения отдельных аминокислот является главным биохимическим симптомом. Сюда относятся: цистинурия, цистиноз, ацидурия β -аминоизомасляной кислоты и глицинурия. Независимо от этого аминокислотурии разного вида могут сопутствовать другим ферментопатиям, как, например, болезнь Wilson (гепато-лентикулярная дегенерация) и галактозурии.

Цистинурия является аномалией, заключающейся в усиленном выделении с мочой больших количеств цистина, лизина, аргинина и орнитина. Этот порок наследуется как рецессивная и частично рецессивная форма. Расстройство вызвано дефектом реабсорбции этих четырех аминокислот из почечных канальцев. В связи со структурным сходством аминокислот, выделяемых при цистинурии, заключающимся в наличии двух амино групп с положительным зарядом и цепи из 4—6 атомов, принимается общий механизм из реабсорбции (28).

Цистин является одной из наиболее трудно растворимых в воде аминокислот, а в моче при pH 5,0—7,0 достигает насыщенного состояния при концентрации 300—400 мг/л. Выделение 0,5—1,0 г цистина в сутки приводит к насыщению мочи, особенно ночью, при максимальной концентрации мочи. Это вероятно является первичной причиной образования цистеиновых камней в мочевыводящих путях, что служит единственным клиническим осложнением при цистинурии. Эта мочекаменная болезнь обладает большой склонностью к рецидивам и встречается прежде всего у гомозигот гена цистинурии. Остальные аминокислоты очень хорошо растворимы, благодаря чему они не принимают участия в формировании цистеиновых камней.

Кроме расстройств в реабсорбции, этой аномалии сопутствует метаболическая блокада в окислении и декарбоксилировании цистина до таурина, выделяемого с нормальной мочой в количестве 85—300 мг в сутки. В моче больных с цистинурией это соединение почти совершенно отсутствует.

	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{HN}=\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{N}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{NH}_3^+ \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$
	Цистин	Лизин	Аргинин	Орнитин
Нормальная моча мг/сутки	10	19	10	10
Цистинурия мг/сутки	730	1800	830	370

Формулы цистина, лизина, аргинина и орнитина и среднее суточное выделение этих аминокислот с нормальной мочой (80, 82, 83), а также с мочой 5 больных с цистинурией (81).

При нагрузке серными аминокислотами — метионином, цистеином и цистин-гичными условиями у здоровых людей. Попытки лечения цистинурии заклю-чаются поэтому в ограничении в диете животного белка, богатого серными аминокислотами, до необходимого минимума, а также применение мочегонных средств и средств, ощелачивающих мочу. Таким образом удастся избежать образования камней путем повышения порога растворимости цистина в ще-лочной среде (79).

Цистиноз является расстройством обмена аминокислот с наиболее тяже-лым течением, обычно со смертельным исходом. Это заболевание описано Fanconi-Debré, цистиновый рахит, цистиновый диабет). Клиническая картина заболевания различна. Однако, на передний план всегда выдвигается рас-стройство, которое заключается в отложении крупных скоплений цистина в тканях. Чаще всего оно встречается у детей грудного и младшего возраста и проявляется тяжелыми симптомами рахита не поддающегося лечению вита-мином D, ацидозом, полиурией, почечной гликозурией, гиперфосфатаземией, электролитическими расстройствами (гиперфосфатемия, гипокалемия), ги-перфосфатурией и аминоацидурией, включающей большинство амино-кислот (глицин, аланин, серин, глутамин, валин, лейцин, изолейцин, фенил-аланин, лизин, цистин, аргинин, пролин).

Иногда заболевание проявляется лишь у взрослых (симптомокомплекс Fanconi у взрослых). Ему часто сопутствует остеомалация, а также все биохи-мические симптомы, включая аминоацидурию, встречаемые при цистинозе детского возраста. Отложения скоплений цистина в тканях не отмечено.

Цистиноз детского возраста наследуется как типичный рецессивный признак, асимптомокомплекс Fanconi у взрослых вероятно вызван дефектом другого гена.

Отложение цистина в тканях вероятно является результатом расстройства ферментной системы, катализирующей окисление этой аминокислоты. Зато остальные биохимические симптомы вызваны порочной реабсорбцией клу-бочкового фильтрата из почечных канальцев. Низкий почечный порог для фосфатов в сочетании с гипофосфатемией вероятно является причиной рахита и остеомалации.

Ацидурия β -аминоизомасляной кислоты наследуется как рецес-сивный признак, вызывающий расстройство реабсорбции. Эта аномалия встречается довольно часто (примерно у 5—10% людей) и проявляется вы-делением с мочой 100—300 мг β -аминоизомасляной кислоты в сутки, тогда как в моче у здоровых людей встречаются лишь следы ее. Она не дает ни-каких клинических симптомов.

Глицинурия является относительно недавно обнаруженной аминоациду-рией (90), заключающейся также в расстройстве реабсорбции. При этом заболевании выделяется примерно 600—1200 мг глицина в сутки (норма 68—199 мг/сутки). Глицинурия вероятно наследуется доминантным геном, сопряженным с хромосомой, детерминирующей пол, так как немногочисленные случаи описаны до настоящего времени исключительно у женщин. Клини-ческим осложнением является образование оксалатных почечных камней, содержащих лишь незначительное количество глицина.

СИНТЕЗ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ

Врожденные изменения количественного состава отдельных белковых фракций плазмы являются результатом полного или частичного выпадения ферментных систем, ответственных за их синтез. Все гипо- и апротеинемии

этого вида удобно разделить на две группы. К первой можно отнести аномалии синтеза преобладающих количественно белков плазмы, альбуминов. Клинически дефициты этих фракций обычно протекают доброкачественно. Ко второй группе относятся аномалии, заключающиеся в полном или частичном выпадении белков, принимающих участие в процессе свертывания крови.

Альбумины и глобулины. Расстройства синтеза альбуминов и глобулинов могут проявляться в форме одновременного снижения уровня обеих белков или дефицита, а иногда и полного отсутствия одной фракции. Механизм наследования этих аномалий окончательно не выяснен, а точное изучение генетических взаимоотношений, частоты проявления, а также качественных и количественных изменений в отдельных гипопроотеинемиях становится возможным лишь теперь, благодаря введению в повседневную практику анализа состава белков плазмы методикой электрофореза на бумаге. Особого внимания в этой группе заслуживает идиопатическая гипопроотеинемия, проявляющаяся клинически отеками (33). При этом заболевании уровень общего белка в сыворотке колеблется в пределах 3,0—5,0%, причем снижается как уровень альбуминов, так и глобулинов. Уменьшается сопротивляемость больных к инфекциям, что, вероятно, связано с гипогаммаглобулинемией.

Среди врожденных дефицитов, обычно обнаруживаемых случайно и касающихся отдельных фракций, гипо- и аальбуминемии обычно протекают бессимптомно, если не считать встречаемую иногда склонность к отекам. Расстройства же синтеза глобулинов и особенно гипо- и агаммаглобулинемия могут повлечь за собой неспособность к образованию антител, связанных с γ -глобулиновой фракцией. Врожденное расстройство образования антител может существовать, однако, независимо от дефекта производства γ -глобулинов, что обнаружено у лиц, обладающих нормальным уровнем этой белковой фракции (6). Таким образом нормогаммаглобулинемия не исключает блокады или выпадения ферментной системы, ответственной за нормальный синтез антител.

Белки системы свертывания крови. Врожденные ферментные дефекты, которые приводят к расстройству синтеза белков свертывания крови, вызывают заболевания, выделенные в следующие нозологические единицы:

Гемофилия, наиболее частое расстройство системы свертывания крови, является аномалией, вызванной полным отсутствием антигемофильного глобулина (гемофилия А), или, реже, фактора Christmas (гемофилия В), необходимых для производства активного тромбопластина. Антигемофильный глобулин находится в плазме и расходуется в процессе образования сгустка, в результате чего в сыворотке он отсутствует. Электрофоретически он ведет себя как β_2 -глобулиновая фракция. Фактор Christmas является белком каталитического характера, не расходуемым в процессе свертывания, благодаря чему он остается в сыворотке после образования сгустка (10, 11, 12, 13, 14, 15). Причиной гемофилии является дефект рецессивного гена, сопряженного с полом в X хромосоме.

Применение препаратов антигемофильного глобулина из крови скота и свиней, активность которого в несколько тысяч раз выше активности глобулина, полученного из человеческой крови, улучшает прогноз при лечении данного заболевания (36, 63).

Тромбастения Glanzmann, которая вероятно наследуется по доминантному и рецессивному признаку, а также наследственная тромбопатия Willebrand-Jürgens, переносимая доминантным геном, являются редко встре-

чаемыми аномалиями. Оба заболевания можно отнести к диспротеинемии ферментных белков тромбоцитарной системы при нормальном количестве тромбоцитов. Первому из них сопутствуют морфологические изменения в тромбоцитарной системе характера агрануло- и анизотромбоцитемии. Лабораторно она проявляется отсутствием или замедлением ретракции сгустка. Тромбопатия Willebrand-Jürgens, проявляющаяся нарушениями в образовании сгустка и большой длительностью кровотечения, приводит иногда к смертельным кровотечениям из желудочно-кишечного тракта. Обе аномалии встречаются чаще у женщин.

К другим, спорадически встречающимся апротеинемиям этого типа, относятся: афибриногенемия и гипофибриногенемия (фибриногенопатия), врожденная гипопротромбинемия Quick, а также отсутствие фактора V Ovens. Генетический механизм передачи этих заболеваний до настоящего времени не выяснен.

ОБМЕН САХАРИДОВ

Ферментативные расстройства обмена сахаридов с клинической точки зрения делятся на две группы:

- 1) аномалии, протекающие бессимптомно;
- 2) ферментопатии, которым сопутствуют тяжелые изменения, часто приводящие к смерти.

К первой группе относятся: почечная глюкозурия, фруктозурия и пентозурия, ко второй: галактоземия (галактозурия), а также заболевания, связанные с патологией накопления гликогена.

ПОЧЕЧНАЯ ГЛЮКОЗУРИЯ

Почечная глюкозурия является аномалией, вызванной вероятно дефектом доминантного аутосомного гена. Обнаруживается она обычно случайно и проявляется в дефекте ферментной системы, ответственной за реабсорбцию глюкозы из почечных канальцев. Уровень глюкозы в крови и сахарные кривые не отклоняются от нормы. Инсулин не оказывает влияния на глюкозурию. Потеря некоторого количества глюкозы в результате понижения почечного порога не оказывает отрицательного влияния на обмен других веществ.

ФРУКТОЗУРИЯ

Фруктозурия вызывается расстройством в области аутосомного рецессивного гена и проявляется выделением с мочой 10—20% фруктозы, полученной с пищей в свободном состоянии или в виде сахарозы. Аномалия эта клинически протекает бессимптомно, но при нагрузке фруктозой наступает длительная и высокая гиперфруктоземия, которой иногда сопутствует значительная гипогликемия. Метаболический дефект по-видимому вызван блокадой фруктокиназы, катализирующей с участием АТФ фосфорилирование фруктозы до фруктозо-1-фосфата. Этот эфир затем включается в гликолитический цикл или разлагается под воздействием 1-фосфофруктоальдозазы до глицероальдегида и гидроксиацетонфосфата.

Сообщения последних лет ставят под сомнение взгляд о бессимптомном течении фруктозурии (25, 39). Описаны отдельные случаи этого заболевания,

$$\begin{array}{c}
 \text{H} \\
 | \\
 \text{C} - \text{O} \\
 | \\
 \text{C} - \text{OH} \\
 | \\
 \text{C} - \text{OH} \\
 | \\
 \text{C} - \text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H} \\
 \text{D-7,5,30-5-} \\
 \text{ф.с.т.г.}
 \end{array}$$

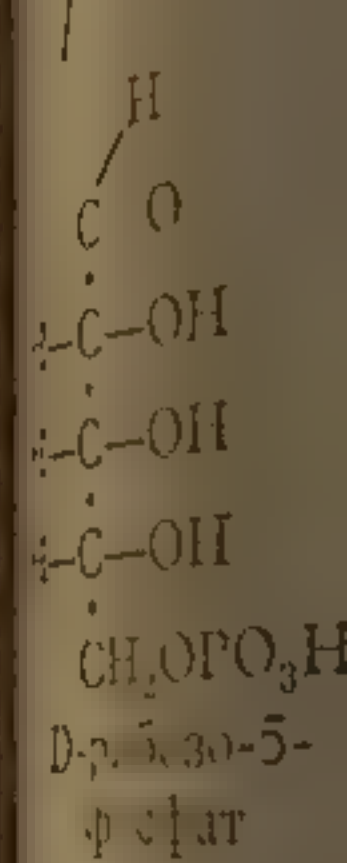


Рис. 7

показали
деляют
боличес
в ксилит

Галактики наследуют кинематические медленные и быстрые вращения, а затем попутные и встречные потоки, а также альбумин и полученный методологический

Пентозурия является клинически бессимптомным расстройством, вызванным ферментативной блокадой в ксилозо-глюкуроновом цикле, о чем свидетельствует гиперксилокетоземия после экспериментальной нагрузки глюкуроновой кислотой (48). Механизм развития этой ферментопатии представлен на рисунке 75. Пентозурия наследуется как рецессивный аутосомный признак и проявляется в выделении с мочой 2—3,5 г/сутки L-ксилокетозы, независимо от количества пептоз, полученных с пищей. Исследования последних лет

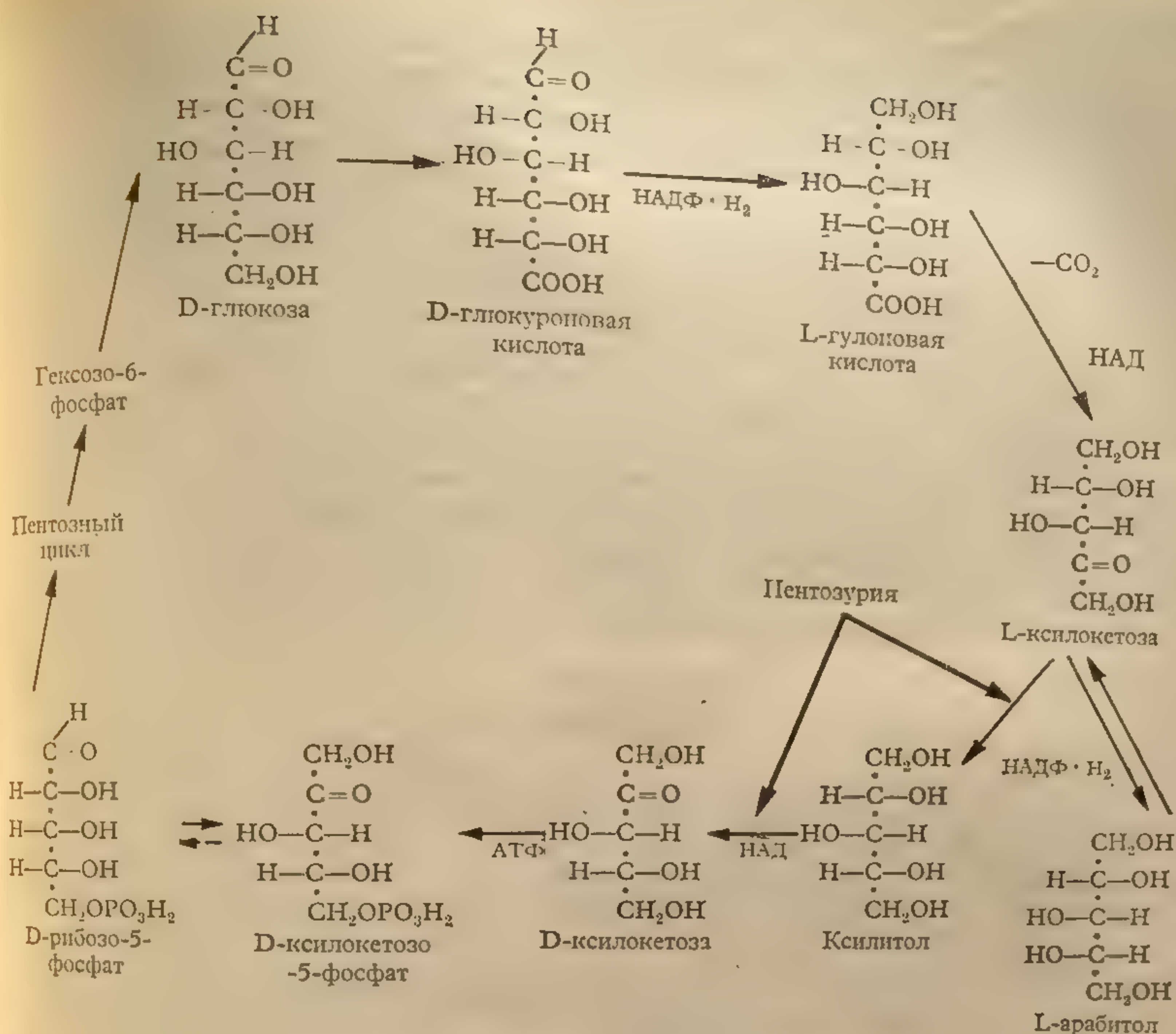


Рис. 75. Глюкуроново-ксилозный цикл и метаболическая блокада при пентозурии.

показали, что люди, страдающие этим дефектом, кроме L-ксилокетозы выделяют с мочой L-арабитол. Эти данные заставляют предполагать, что метаболическая блокада скорее всего находится на уровне перехода L-ксилокетозы в ксилитол или ксилитола в D-ксилокетозу (87, 88).

ГАЛАКТОЗЕМИЯ И ГАЛАКТОЗУРИЯ

Галактоземия и галактозурия — расстройства, сходные с фруктозурией, наследуются вероятно также как рецессивный признак, но с очень тяжелым клиническим течением. Заболевание проявляется у новорожденных немедленно после первых приемов пищи, содержащей галактозу. Кроме биохимических симптомов — галактоземии и галактозурии, появляются клинические симптомы: увеличение печени, с возможностью появления желтухи, а затем жировой дегенерации, иногда увеличение селезенки, рвота, поносы, помутнение хрусталиков (галактоземическая катаракта), торможение умственного развития, а часто и физического, повреждение почек с последующей альбуминурией и аминокислотурией. С мочой выделяется 50—80% галактозы, единственным эффективным методом лечения этого заболевания является немедленное и во всяком случае

перед концом второго месяца жизни, удаление из диеты, пищи, содержащей галактозу (51). Поэтому очень важно поставить диагноз данного заболевания сразу же после появления первых симптомов. В лабораторной диагностике особое значение имеет хроматографический анализ сахаридов в моче. Раннее применение безгалактозной диеты приводит к быстрому исчезновению клинических симптомов и предотвращает появление стойких изменений, сопутствующих

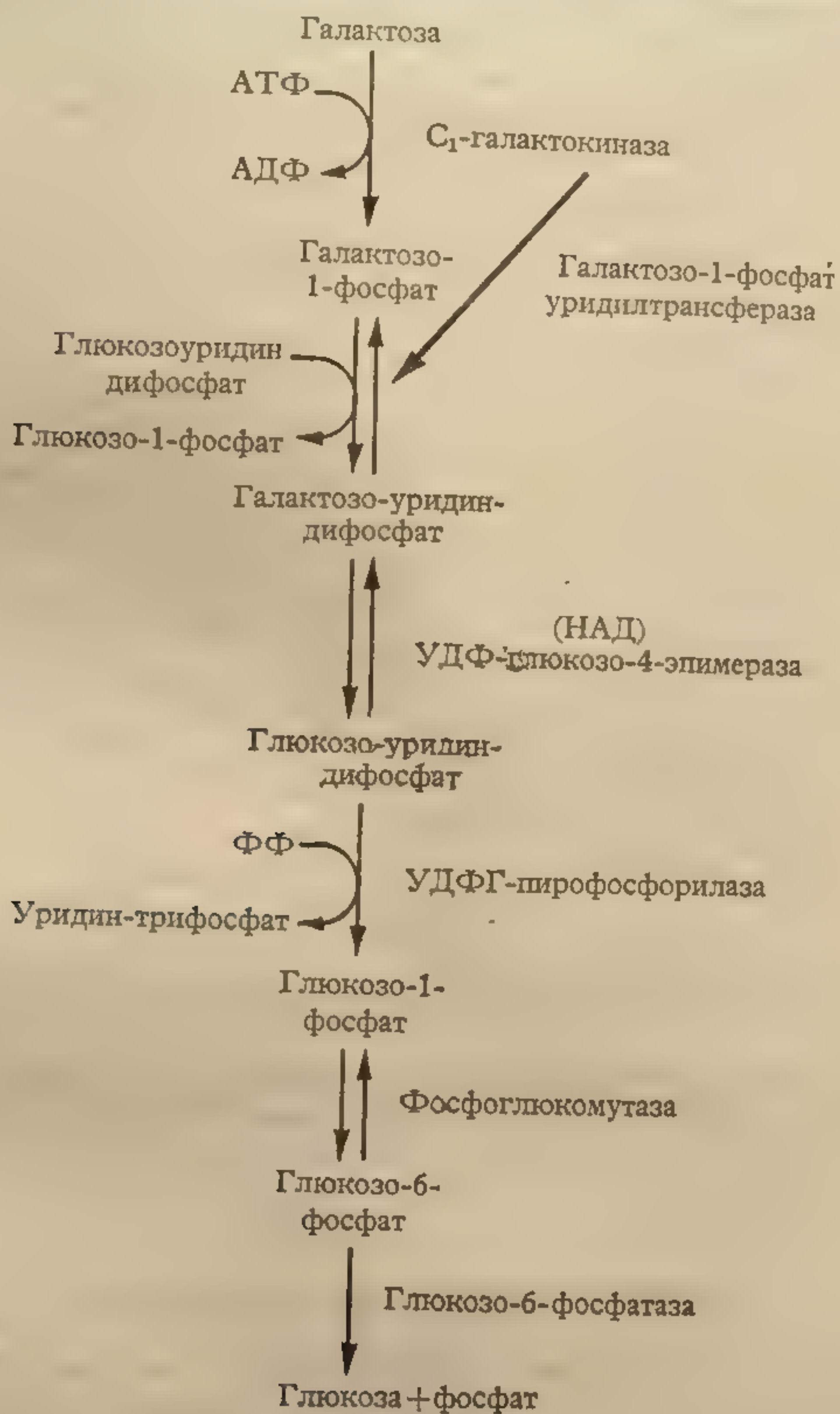


Рис. 76. Промежуточные этапы превращения галактозы в глюкозу и метаболическая блокада этого процесса при галактоземии.

ющих данному заболеванию (55). Толерантность этого сахара повышается у людей зрелого возраста, у которых клинические симптомы не носят уже такого бурного характера.

Причиной заболевания является неспособность к превращению галактозы в глюкозу. Несмотря на единственную разницу между этими двумя сахарами в углеводе C_4 (конфигурация D в глюкозе и L в галактозе), превращение галактозы в глюкозу является сложным циклом обмена, происходящим

в несколько этапов (смотри рисунок 76). Метаболические расстройства при галактоземии заключаются в блокаде галактотрансферазы (галактозо-1-фосфат-уридин-трансфераза), катализирующей переход 1-фосфатгалактозы в уридин-галактозодифосфат с одновременным превращением уридин-глюкозодифосфата в 1-глюкозофосфат. Выпадение функции этого фермента влечет за собой накопление большого количества галактозо-1-фосфата. В то же время активность галактокиназы, катализирующей фосфорилирование галактозы с образованием галактозо-1-фосфата и галактозальденазы (УДФ-глюкозо-4-эпимераза), преобразующей галактозу-уридин-дифосфат в глюкозу-уридин-дифосфат, при этом заболевании остается совершенно нормальной. Благодаря этому превращение глюкозы в галактозу не блокируется и даже при диете, полностью лишенной галактозы, эндогенное образование ее из глюкозы полностью покрывает потребности организма в этом сахаре, необходимым для синтеза галактолипидов центральной нервной системы (56).

Появление клинических симптомов объясняется токсическим действием галактозо-1-фосфата прежде всего на печень и хрусталик глаза. Подтверждают это эксперименты на животных, у которых удается вызвать сходные клинические состояния при диете, очень богатой галактозой, содержащей 30—70% этого сахара (46, 75).

ГЛИКОГЕНОЗЫ

Общим признаком всех гликогенозов, наследуемых, вероятно, как рецессивный признак, являются дефекты ферментных систем, ответственных за введение гликогена на путь обмена сахаридов. Результатом такой блокады является накопление гликогена в органах, гипергликогенемия и гипогликемия. Недостаточное снабжение тканей глюкозой приводит к задержке роста. Эти заболевания кончаются смертью в раннем возрасте, вследствие гипогликемического шока, сердечной недостаточности или инфекционного заболевания, ввиду полного отсутствия сопротивляемости больных к последним.

Гликогенозы проявляются в нескольких вариантах, отличающихся локализацией ферментативной блокады, химической структурой накопленного гликогена и распределением его в разных органах (60).

В классической форме (тип I), так называемой болезни Gierke или печеночно-почечном гликогенозе, ферментативная блокада касается печеночной и почечной глюкозо-6-фосфатазы, катализирующей разложение глюкозо-6-фосфата до свободной глюкозы. Это приводит к накоплению в перечисленных выше органах гликогена, ничем не отличающегося от нормального гликогена.

Тип II является генерализованной формой, при которой гликоген как и в типе I, не отличается строением от нормального, но он откладывается во всех тканях. При этой форме ферментного дефекта до сих пор не обнаружено.

При типе III, также генерализованного характера, гликоген отличается от нормального длиной боковых цепей, которые состоят из более коротких отрезков, чем в нормальном гликогене. К этому расстройству приводит дефект амило-1:6-глюкозидазы, расщепляющей гликозидные связи между углеродом 1 и 6.

Тип IV проявляется накоплением гликогена с чрезмерно длинными боковыми цепями. Ферментативная блокада в этом типе вероятно касается амило-(1:4 → 1:6)-трансглюкозидазы (разветвляющая α -гликоновая гликозил-трансфераза), ответственной за нормальное распределение разветвлений в молекуле гликогена.

Последние две разновидности этого расстройства заключаются в дефекте фосфорилаз. В первой из них, так называемой болезни McArdle, наступает

гиперлипемия или гиперхолестеринемия, с отсутствием или более слабо обозначенной склонностью к отложению этих соединений в органах. В противоположность ферментопатиям белкового и углеводного обмена, при которых механизм и локализация ферментативной блокады преимущественно выяснен, все теории относительно аномалий жирового обмена имеют до настоящего времени исключительно гипотетический характер. Для многих нозологических единиц не удалось также установить способа наследования.

ЛИПОИДОЗЫ (ТЕЗАУРОЗЫ)

Болезнь Gaucher наследуется вероятно как рецессивный признак и заключается в отложении керазина — цереброзида, содержащего лигноцериновую кислоту в клетках ретикуло-эндотелиальной системы. Это заболевание протекает различно в зависимости от возраста, в котором появляются первые симптомы. Редкая форма раннего детского возраста проявляется жировой инфильтрацией почти всех органов, главным образом печени, селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, и особенно желез внутренней секреции и легких. Заболеванию сопутствуют тяжелые симптомы со стороны центральной нервной системы: полная задержка психического развития, усиление сухожильных рефлексов, опистотонус, несмотря на это в мозгу не отмечается изменений, типичных для остальных органов. Затруднение приема пищи, вызванное нервно-мышечными симптомами, дисфагией, тризмом жевательных мышц или спазмом гортани, приводит к истощению и смертельному исходу.

В зрелом возрасте заболевание встречается чаще и протекает легче, без симптомов со стороны центральной нервной системы. Кроме типичных инфильтратов во внутренних органах и часто в костном мозге, единственным субъективным симптомом являются приступообразные костные боли с повышением температуры, как при ревматических болях. Диагноз облегчает биопсия костного мозга (клетки Gaucher).

Болезнь Niemann-Pick является расстройством, при котором отлагается главным образом сфингомиелин, без избирательного сродства к ретикуло-эндотелиальной системе. Встречается главным образом в раннем детском возрасте и проявляется отсутствием аппетита, рвотой, обезвоживанием и воскообразностью кожи, увеличением печени и селезенки. В отличие от болезни Gaucher нервно-мышечные симптомы отсутствуют. Заболевание кончается смертью между первым и вторым годом жизни. До настоящего времени описаны лишь отдельные случаи заболевания в детском возрасте (86).

Ввиду того, что за синтез и распад цереброзида и сфингомиелина ответственна та же ферментная система, считается, что причиной обоих этих заболеваний являются неизвестные кинетические расстройства, заключающиеся в перемещении равновесия реакции в направлении синтеза. Предшественником для обоих соединений, согласно этой гипотезе, является лигноцеринат аминокислоты сфингозина, из которого, путем присоединения глюкозы или галактозы, образуются цереброзиды (глюкозные или галактозные), а путем присоединения фосфохолина — сфингомиелин. Эти взаимоотношения иллюстрирует рисунок 78.

Ксантоматозы — это группа заболеваний, при которых основным симптомом является отложение в разных тканях холестерина. Их делят на нормо- и гиперхолестеринемические. К последним относятся прежде всего ксантомы кожи оранжевожелтого цвета и важные с клинической точки зрения ксантомы эндотелия артерий и эндокарда. Они часто появляются в венечных сосудах и могут привести к закупорке последних.

Нормохолестеринемический ксантоматоз (болезнь Schüller-Christian) отличается от других заболеваний этой группы прежде всего жировыми изменениями в скелете. Кроме того холестерин может скапливаться в легких и плевре, где рентгенологически дает картину, сходную с милиарным и фиброзным туберкулезом. Поражение мозговых оболочек и мозга приводит к увеличению внутричерепного давления и экзофтальму. Иногда, в результате поражения гипофиза, появляется несахарный диабет. Как и при других тезауриозах, холестерин может откладываться также в печени, селезенке, железах внутренней секреции и лимфатических узлах. Однако во всех формах этого заболевания уровень холестерина в крови остается нормальным.

Причина расстройств, проявляющихся отложением холестерина, неизвестна. Принято считать, что имеет место нарушение нормальных взаимоотношений между синтезом этого соединения и выделением его из организма.

Синдром Hurler-Pfaundler клинически проявляется задержкой умственного развития (*idiotismus*) и деформацией костей и хрящей. Причиной этой аномалии раньше считалось отложение ганглиозидов — соединений, построенных из нейраминовой кислоты, галактозы, глюкозы, сфингозина и аминоксахарида. Более новые исследования показали, что аминоксахаридом ганглиозидов является хондрозамин (аминогалактоза), то есть составная часть хондроитинсерной кислоты, которая является строительным материалом соединительной ткани. Поэтому можно было бы считать, что аномалия эта заключается в ферментативном дефекте обмена мукополисахаридов.

ГИПЕРЛИПЕМИЯ И ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЯ

Эти заболевания имеют большое клиническое значение, так как ряд наблюдений свидетельствует о том, что они принимают участие в развитии вторичных артериосклеротических изменений. Невозможно провести точной границы между ними и ксантоматозом, так как последний может появиться как вторичный симптом обоих заболеваний.

Гиперлипемия детского возраста с последующим ксантоматозом в большинстве случаев проявляется увеличением печени и селезенки. Этих симптомов обычно не бывает при гиперлипемии у взрослых, которой довольно часто сопутствует незначительная гипергликемия и глюкозурия. Гиперлипемия касается главным образом простых жиров, при незначительной лишь гиперхолестеринемии и гиперфосфолипидемии. Увеличенное содержание жиров вызывает опалесценцию и помутнение сыворотки, а в электрофоретическом спектре дает увеличение α_1 , α_2 и β_1 глобулиновых фракций, с которыми комплексы образуют как простые жиры, так и холестерин и фосфолипиды.

Вопрос вторичного появления артериосклеротических изменений как последствия врожденной гиперлипемии все еще остается открытым. Данные, полученные до настоящего времени, не свидетельствуют о том, что эта аномалия является причиной частой заболеваемости сосудистой системы (86).

Гиперхолестеринемия является расстройством, которому чаще всего сопутствуют артериосклеротические изменения в молодом возрасте (7). Уровень общего холестерина в крови увеличивается в 2—4 раза, при сохранении нормального отношения свободного холестерина к этерифицированному.

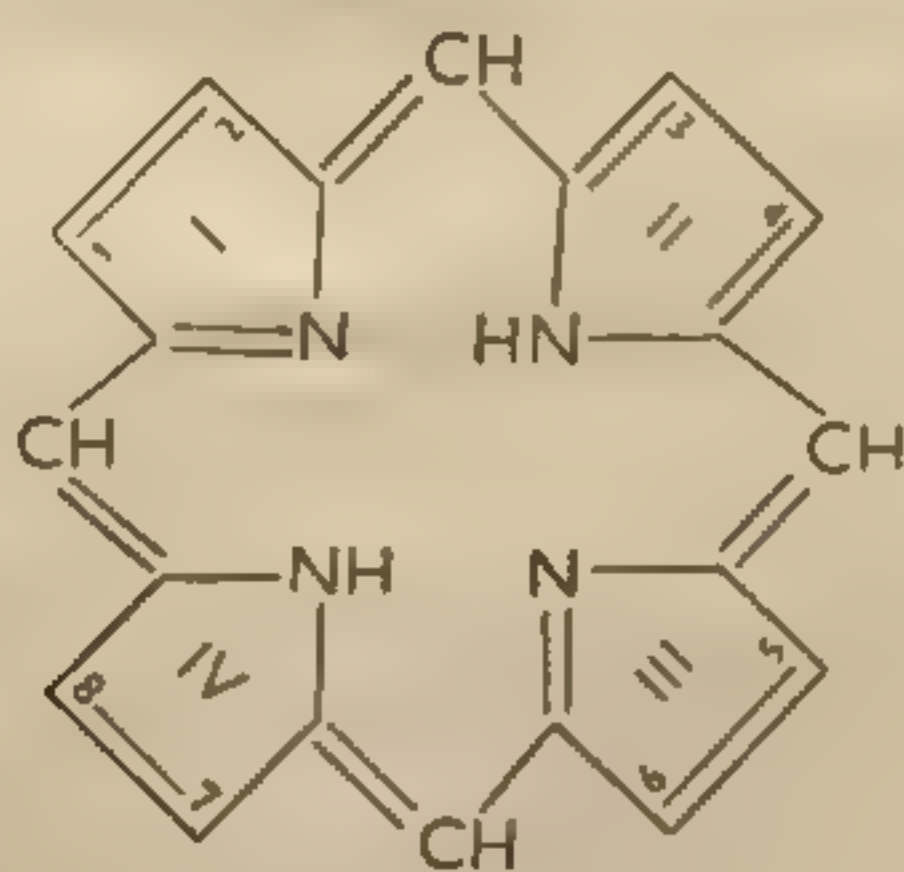
Это заболевание наследуется как доминантный признак и вероятно является результатом гиперфункции ферментной системы, взаимодействующей с коферментом А, ответственным за синтез эндогенного холестерина из ацетатов. В противоположность гипергликемии, принятый внутрь (экзогенный) холестерин вызывает лишь незначительный рост уровня этого соединения в крови.

ОБМЕН ГЕМОПРОТЕИДОВ

Врожденные аномалии обмена гемопротеидов касаются как пигментной части, так и белкового компонента этих соединений. Ввиду частоты проявления основное место в этой группе заболеваний занимают расстройства обмена гемоглобина. Порочный метаболизм предшественников гема приводит к заболеваниям под общим названием порфирия, а дефекты синтеза белковой части приводят к образованию патологических форм гемоглобина и связанных с ними аномалиями раннего типа. В результате врожденной блокады окислительно-восстановительной системы эритроцитов появляется метгемоглобинемия (гемиглобинемия). Из аномалий обмена пироловых пигментов, производных гема, к врожденным ферментопатиям относится расстройство этерификации билирубина глюкуроновой кислотой. И наконец к группе расстройств, охватывающих неправильный синтез гемопротеидов, относится также врожденная акаталазия.

ОБМЕН ПОРФИРИНОВ

Исходной субстанцией порфириновых соединений является порфириновый цикл, состоящий из четырех пироловых колец, соединенных четырьмя метиновыми связями. Порфирины образуются путем замещения атомов водорода порфина в положениях 1—8 разными группами (метиловыми, этиловыми, виниловыми и так далее). Имеющиеся в человеческом организме порфирины

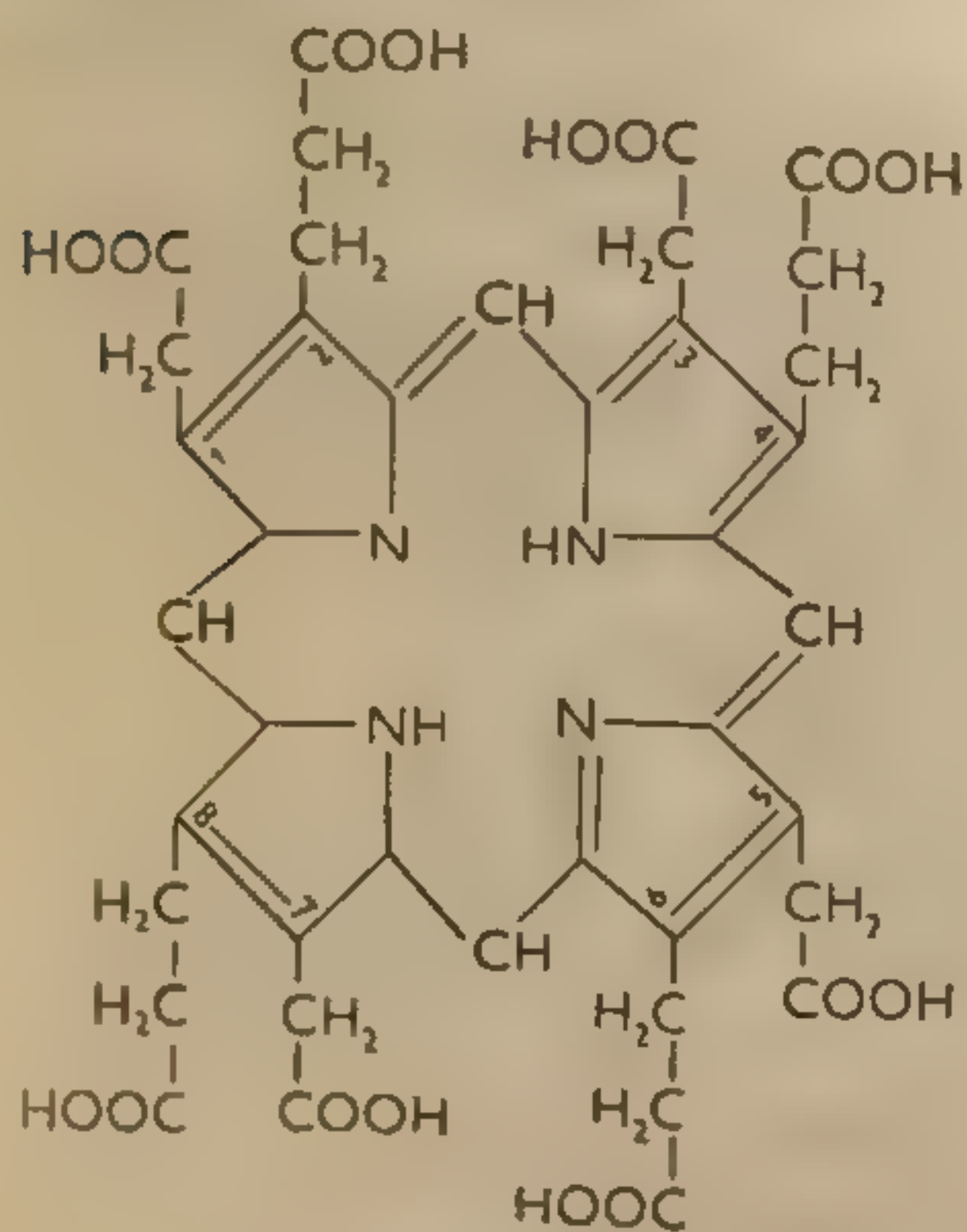


Порфин

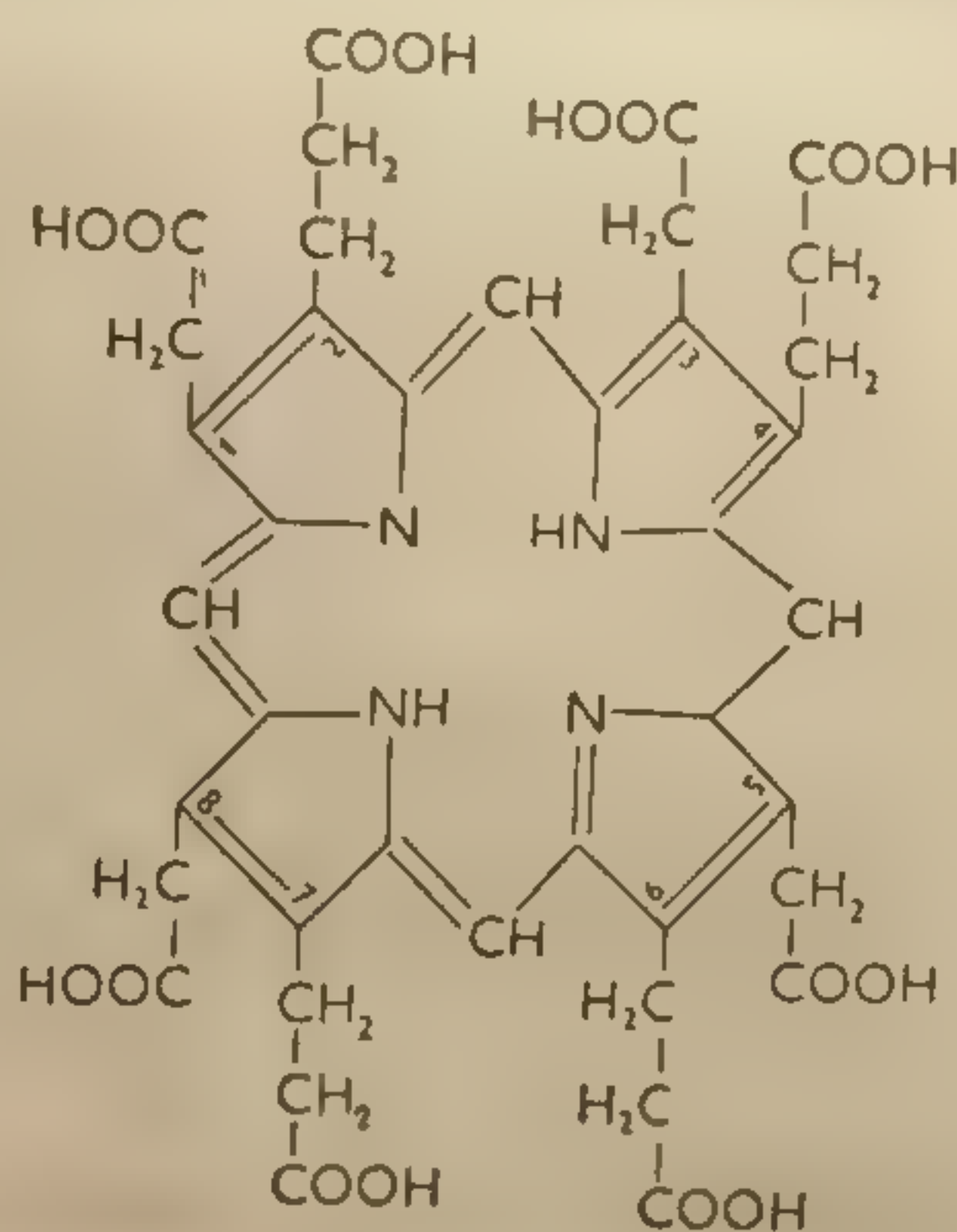
можно считать производными так называемого уропорфина, то есть таких производных порфина, в которых атомы углерода 1—8 замещены четырьмя карбоксиметиловыми и четырьмя карбоксиэтиловыми группами. В зависимости от положения, которое занимают эти группы, могут возникать 4 изомера уропорфина, так же, как синтетические этиопорфирины, то есть метило-этиловые производные порфина. Естественные порфирины являются с химической точки зрения производными только двух изомерных разновидностей уропорфина, так называемого уропорфина I и III, причем количественно тип III значительно преобладает над типом I. Уропорфин I является порфирином, в котором атомы водорода в положениях 1, 3, 5, 7, замещены карбоксиметиловыми группами, а в положениях 2, 4, 6, 8 — карбоксиэтиловыми группами то есть симметричным соединением, в котором обе группы расположены через одну. Уропорфин 3 построен несимметрично: водороды в положении 1, 3, 5, 8 замещены карбоксиметиловыми группами, а в положении 2, 4, 6, 7 — карбоксиэтиловыми.

При декарбоксилировании карбоксиметиловых групп вместо них возникают метиловые остатки, а соединения, возникшие в результате этого процесса,

носят название копропорфиринов. Аналогично уropopфирину I и III, копропорфином, а копропорфирин III — 1, 3, 5, 8 тетраметил — 2, 4, 6, 7 тетраэтилкарбоксилпорфином.

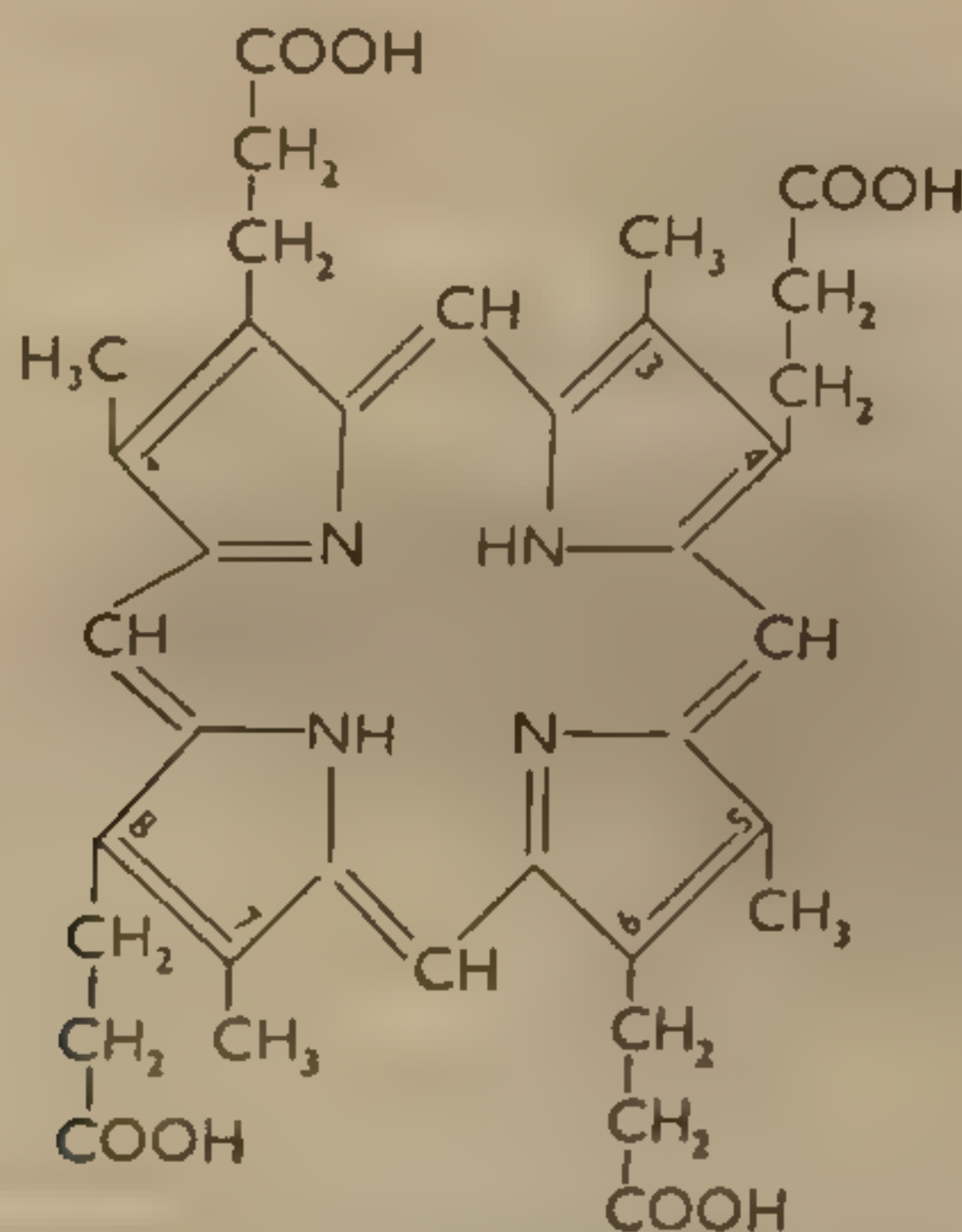


Уропорфирин I



Уропорфирин III

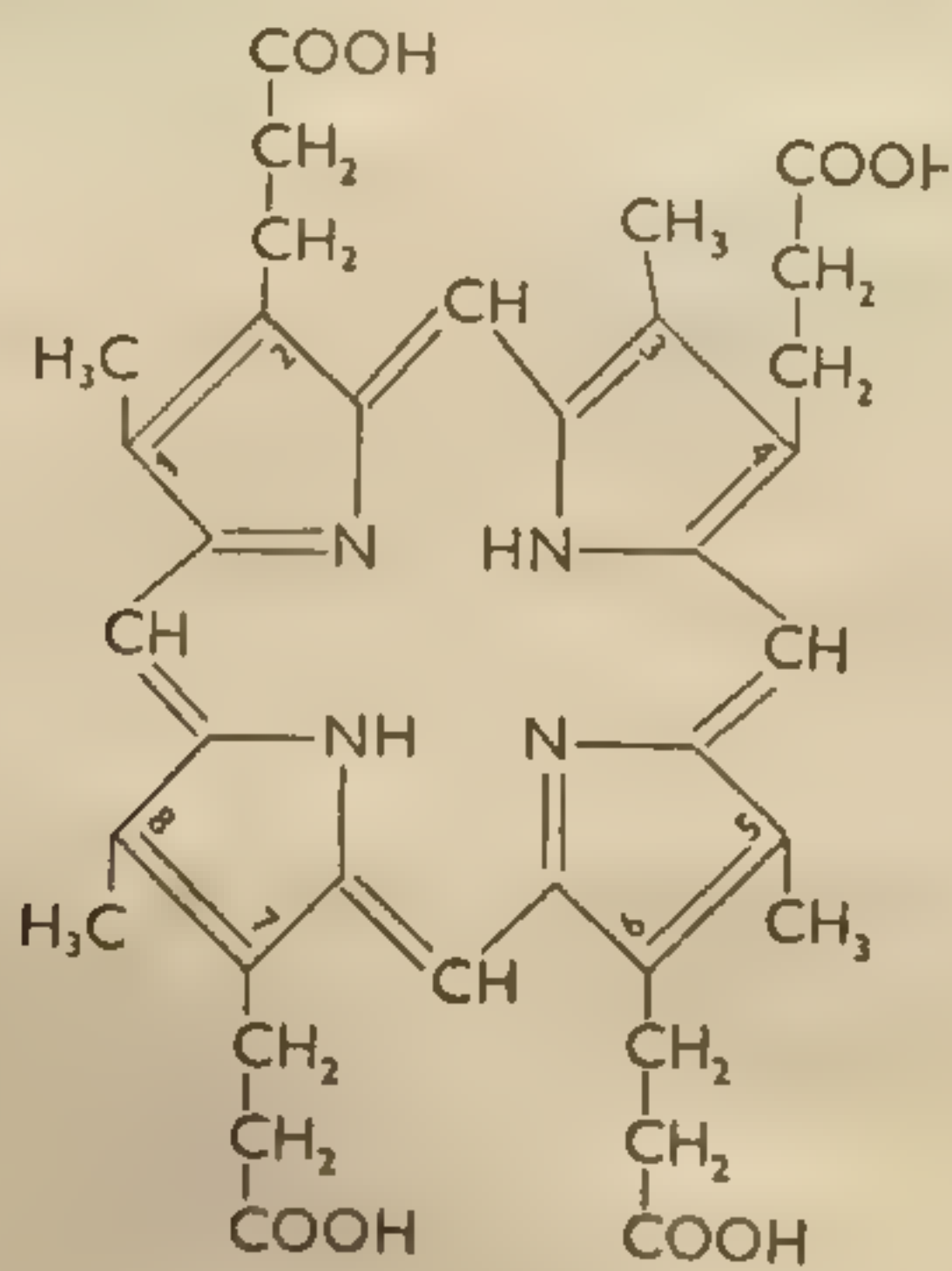
Гем относится к группе так называемых протопорфиринов. Этим термином называются порфирины, производные копропорфрина, в которых две карбоксиэтиловые группы подверглись окислительному декарбоксилированию с образованием на их месте виниловых групп. Таким образом вместо них



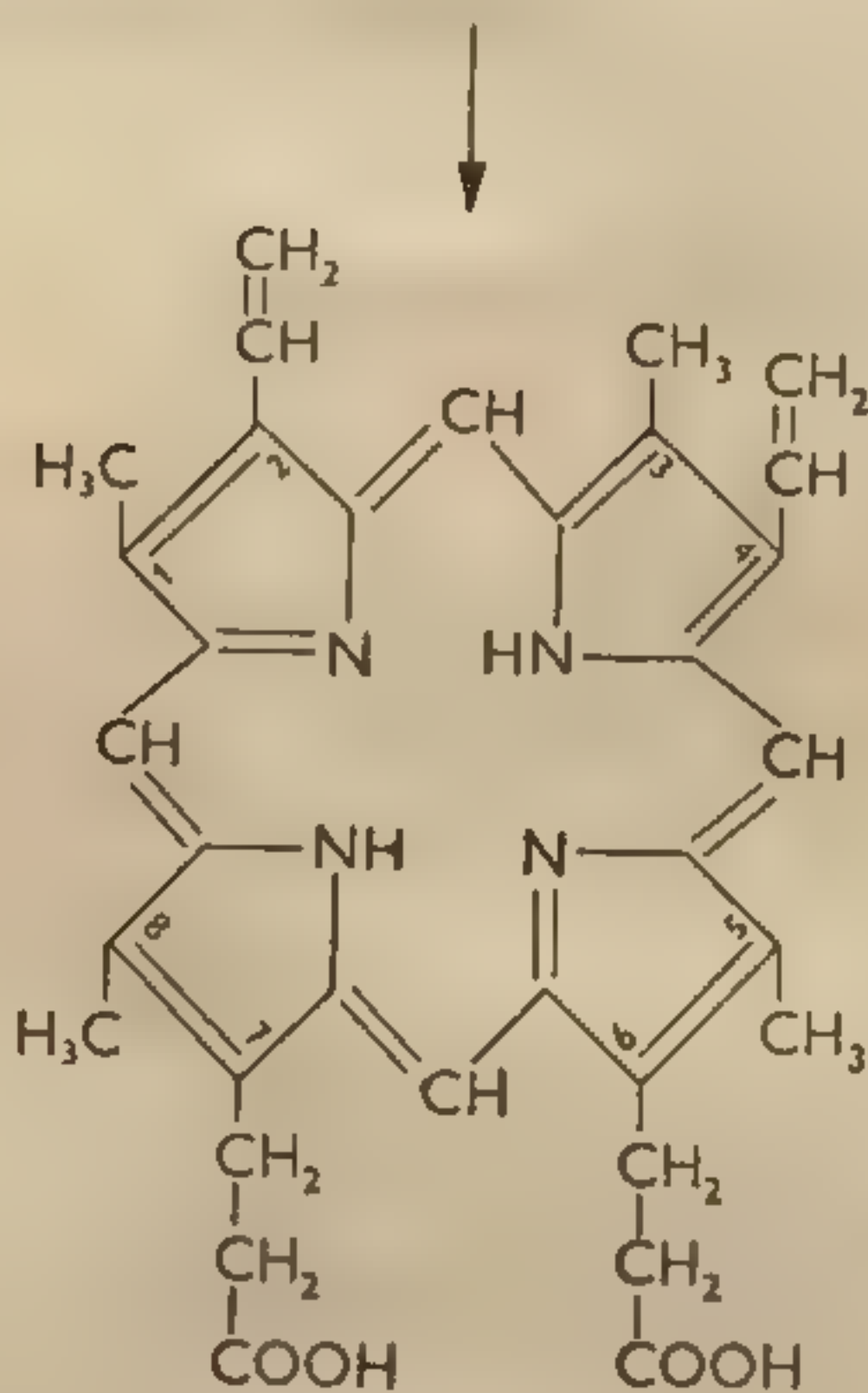
Копропорфирин I

имеются 4 метиловые группы, 2 карбоксиэтиловые и 2 виниловые группы, что дает возможность образования 15 изомеров. Среди всех возможных изомеров протопорфиринов только тип IX имеется в организме. В сочетании с железом, как железопротопорфирин IX дает гем, который является протестической группой гемоглобина и всех других естественных гемопротеидов

человеческого организма. Протопорфирин IX с химической точки зрения можно считать производным копропорфирина III, в котором карбоксиэтиловые группы в положении 2 и 4 подверглись окислительному декарбоксилированию с образованием на их месте виниловых групп. Он, таким образом, является 1, 3, 5, 8 тетраметил-2,4 дивинил-6,7 дикарбоксиэтилпорфирином.



Копропорфирин III



Протопорфирин IX

Эндогенный синтез порфиринов является сложным процессом и до настоящего времени точно изучены лишь начальные этапы этих видов обмена (31, 32, 64, 66, 77). Исходные субстанции для биосинтеза пироловых соединений образуются в так называемом янтарно-глициновом цикле, тесно связанном с обменом три- и дикарбоновых кислот (цикл Кребса). Путем конденсации молекулы сукцинат-кофермента А, метаболита цикла Кребса, с глицином образуется α -амино- β -кетoadипиновая кислота, которая путем дикарбоксилирования переходит в Δ -аминолевулиновую кислоту (рисунок 79).

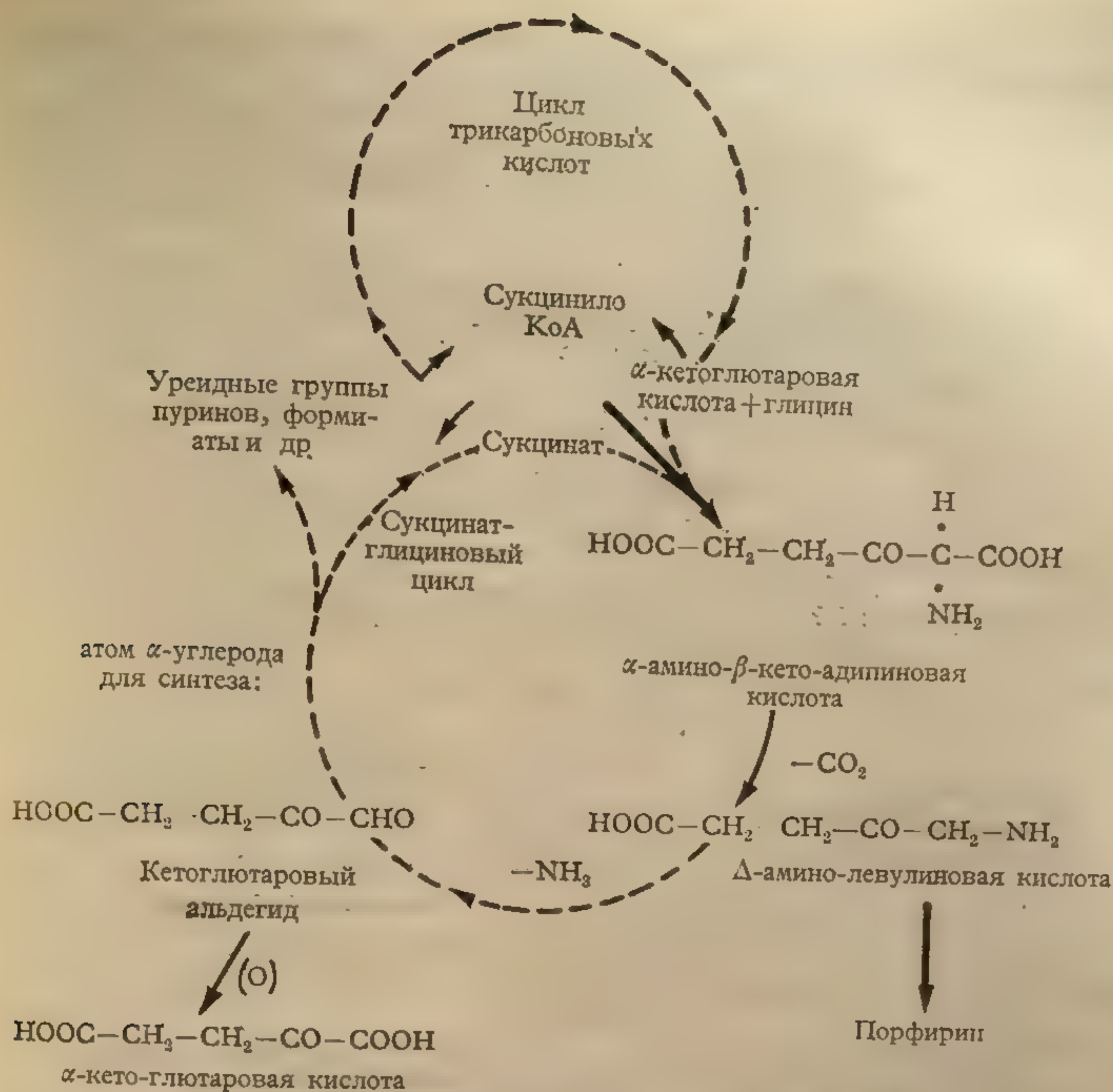


Рис. 79. Сукцинат-глициновый цикл. \rightarrow — направление усиленного обмена при острой идиопатической порфирии (?).

Конденсация двух молекул Δ -амино-левулиновой кислоты при соучастии специфической дегидратазы (42) приводит к образованию порфобилиногена, истинного пиролового предшественника порфиринов (80). Данные относительно дальнейшего метаболизма порфобилиногена все еще носят гипотетический характер. Вероятный путь этих изменений представлен на рисунке 81.

Врожденные расстройства синтеза порфиринов приводят к порфирии. Различают 3 клинические формы этого заболевания: врожденную порфирию,

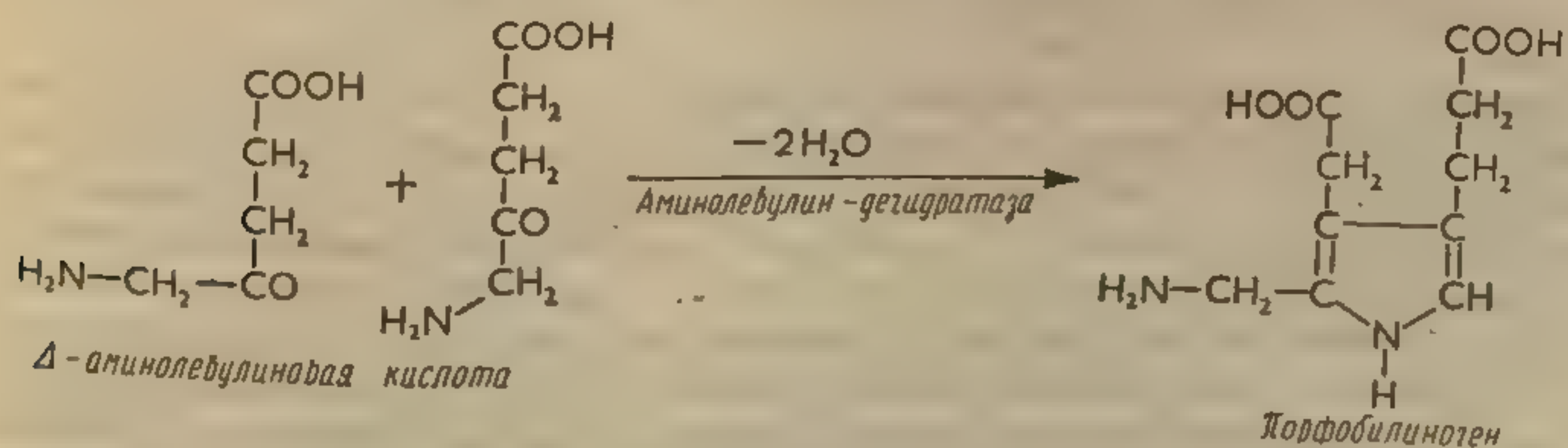


Рис. 80. Механизм синтеза порфобилиногена путем конденсации двух молекул Δ -амино-левулиновой кислоты.

острую идиопатическую порфирию и порфирию смешанного типа (*porphyria cutanea tarda*) (89).

Врожденная порфирия с клинической точки зрения прежде всего характеризуется повышенной чувствительностью к свету. Этот симптом, вызванный так называемым фотодинамическим эффектом порфиринов

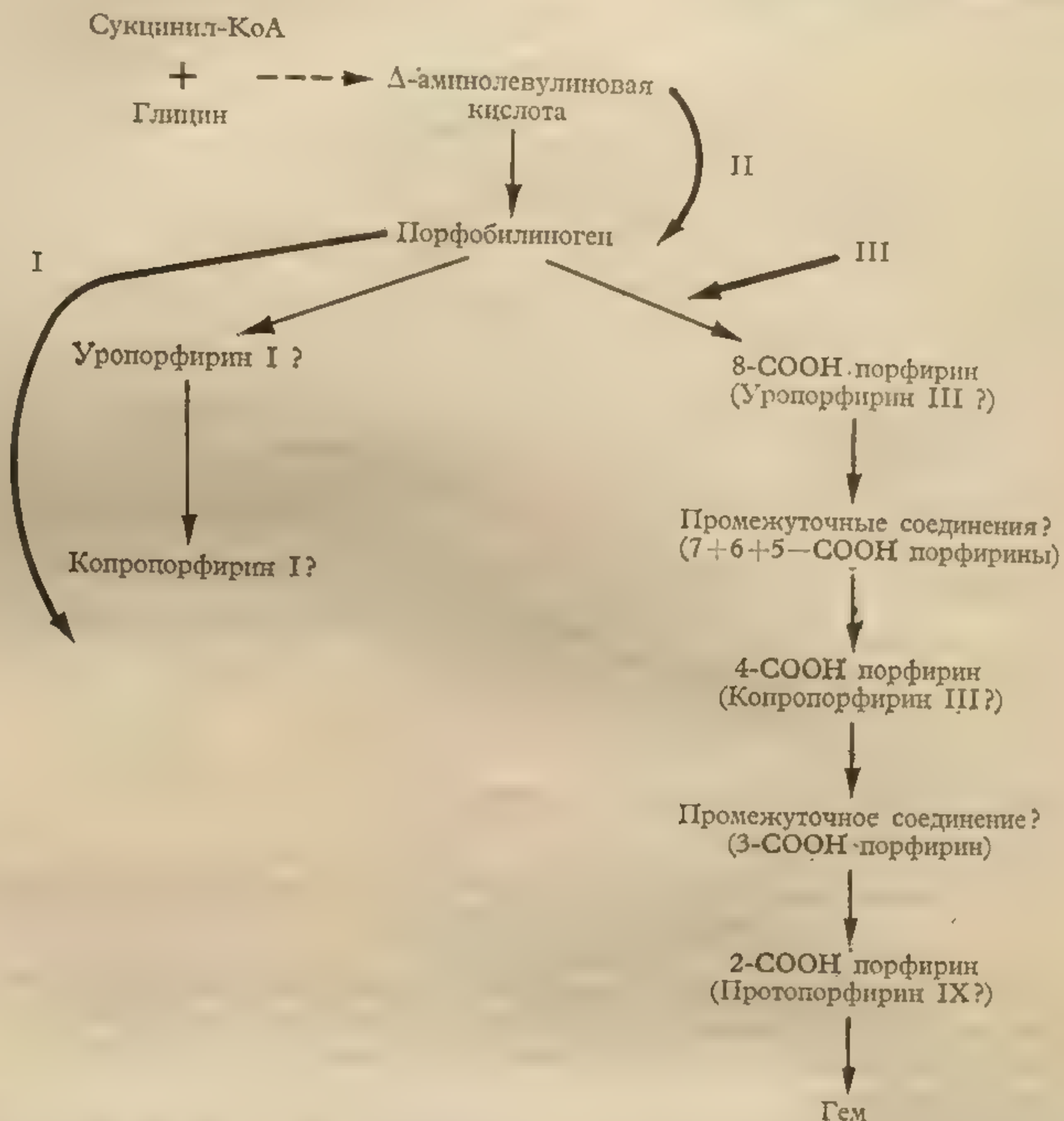


Рис. 81. Промежуточные этапы превращения порфобилиногена в гем. I — направление усиленного обмена при врожденной порфирии(?), II — направление усиленного обмена при острой идиопатической порфирии(?), III — гипотетическая метаболическая блокада при острой идиопатической порфирии(?).

и заключающийся в освобождении гистамина (33), остается у больного в течение всей жизни и приводит к тяжелым кожным изменениям. Порфирины отлагаются в разных тканях (костный мозг, скелет, зубы, кожа), которые окрашиваются в краснокоричневый цвет и обладают характерной красной флуоресценцией в ультрафиолетовом свете. Также и эритроциты, плазма, и увеличенная обычно селезенка содержат большое количество порфиринов, а с калом и окрашенной в коричневый цвет мочой выделяются главным образом уро- и копропорфирины I типа, причем суточное количество этих соединений в моче может достигать до 50 мг/сутки (норма — 0,08 мг). С мочой выделяется гораздо больше уропорфиринов, чем копропорфирин, а в кале

наоборот, копропорфирина выделяется гораздо больше. Современные методы разделения порфиринов позволили установить, что наряду с уро- и копропорфирином I с мочой выделяется также небольшое количество других порфириновых соединений с 4—7 карбоксильными группами.

Современные сведения о биосинтезе порфиринов позволяют лишь приблизительно выяснить механизм этого вероятно рецессивно наследуемого заболевания. В нормальном костном мозге обмен порфобилиногена в порфирин направлен соответствующей ферментной системой, в результате чего образуются главным образом порфирины III типа, используемые для синтеза гемопротендов и небольшое количество бесполезных порфиринов I типа, удаляемых из организма. При врожденной порфирии продукция порфиринов I типа усилена (до 100 мг в сутки и больше), а ввиду того, что организм совершенно не метаболизирует их, они откладываются в тканях и выделяются с мочой и калом. Поэтому данное расстройство можно интерпретировать как расстройство нормального равновесия синтеза обоих типов порфиринов из порфобилиногена, то есть мутацией, заключающейся в порочной для организма гиперфункции ферментной системы, ответственной за продукцию порфирина I типа.

Острая идиопатическая порфирия передается, вероятно, как неполностью доминирующий признак, проявляющийся клинически прежде всего приступообразными расстройствами со стороны желудочно-кишечного тракта (боли в брюшной полости, рвота, запоры). Кроме того, особенно в так называемой подострой форме, могут появляться расстройства со стороны нервной системы (невриты, боли кожи, прогрессирующие параличи, эпилептоидальные приступы и психические расстройства). Иногда обе формы появляются у одних и тех же лиц. Течение заболевания обычно хроническое, а в периодах клинической ремиссии между острыми приступами удерживаются лишь биохимические изменения.

Другой патологической составной частью мочи при острой идиопатической порфирии является порфобилиноген, выделяемый в количестве до 100 мг/сутки. Кроме того, встречаются относительно большие количества Δ -аминолевулиновой кислоты (10—15 мг/сутки) и небольшие — уро- и копропорфирина III в виде комплекса с цинком. Моча, в которой основным патологическим элементом является порфобилиноген, по окраске не отличается от нормальной, но темнеет при стоянии ввиду перехода порфобилиногена в порфирин и краснокоричневый порфобилин. В кислой среде этот процесс происходит быстрее.

Ферментный дефект, вызывающий острую порфирию, легче интерпретировать, чем в случае врожденной порфирии. Выделение большого количества порфобилиногена при незначительном увеличении концентрации порфиринов III типа и отсутствие фотодинамического эффекта заставляют предполагать, что в этом случае имеет место или усиленная продукция порфобилиногена, или затрудненный синтез тетрапиролового ядра. Ввиду того, что при этом заболевании имеет место также увеличение количества Δ -аминолевулиновой кислоты, расстройства могут также заключаться в нарушении равновесия между количеством этого соединения, использованным для синтеза порфобилиногена и количеством, подвергающимся дальнейшему обмену, через фазу α -кетоглутарового альдегида. Наконец, последняя гипотеза объясняет это расстройство патологическим усилением динамики сукцинат-глицинового цикла, что влечет за собой увеличение продукции Δ -аминолевулиновой кислоты и порфобилиногена. Это состояние вызывает смещение равновесия в направлении синтеза порфиринов типа III, о чем свидетельствует увеличенное выделение этих соединений с мочой больных.

Смешанная порфирия (*porphyria cutanea tarda*) появляется в зрелом возрасте и проявляется клиническими (повышенная чувствительность к свету, приступообразные боли в брюшной полости) и биохимическими симптомами, типичными для врожденной острой порфирии, но гораздо менее интенсивными. Механизм этого расстройства до настоящего времени совершенно не выяснен.

ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ГЕМОГЛОБИНА

Различные разновидности гемоглобина, за исключением эмбрионального гемоглобина F, вероятно являются продуктами аллеломорфных генов нормального гемоглобина A. До настоящего времени, кроме физиологических форм гемоглобина: A (нормальный гемоглобин), F (эмбриональный гемоглобин) и P (гемоглобин раннего внутриутробного периода), метгемоглобинемии и сульфгемоглобинемии, выделено 9 следующих разновидностей (30) с идентичной простетической группой и молекулярным весом, и лишь незначительно измененным составом аминокислот. Зато отдельные разновидности гемоглобина обладают различными физикохимическими свойствами: электрофоретической подвижностью, резистентностью к денатурирующему действию щелочей и редукции $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, растворимостью редуцированной формы и кривой диссоциации кислорода. Считается что в этиологии появления патологических форм гемоглобина играет роль извращение синтеза белковой части, вызванное изменением матрицы нуклеиновых кислот, на которой „размножается“ соответственная ферментная система. Это приводит к продукции глобинов, в которых одни аминокислоты замещают другие, имеющиеся в нормальном глобине, или же изменяется их нормальная последовательность в пептидной цепи. Разные формы гемоглобина связаны с проявлением различных форм анемии.

Серповидноклеточная анемия. При этом заболевании, наследуемом по рецессивному признаку, гемоглобин S, который имеется вместо нормального гемоглобина A, отличается от последнего электрофоретической подвижностью (69) и наличием валина вместо глутаминовой кислоты (52). Это незначительное изменение состава аминокислот приводит к тому, что гемоглобин S отличается от гемоглобина A (Таблица 19). Пониженная растворимость

Таблица 19

Физикохимические свойства нормального гемоглобина (Hb A), эмбрионального гемоглобина (Hb F), и гемоглобина при серповидноклеточной анемии (Hb S) (согласно 23)

Вид гемоглобина	Денатурация щелочами	Электрофоретическая подвижность $\times 10^{-5}$ см ² /вольт/сек.	Изоэлектрическая норма	Растворимость редуцир. Hb	Кривая диссоциации O ₂
Hb A	не устойчив	2,4	6,87	большая	нормальная
Hb F	устойчив	2,4	7,00	большая, чем A	патологическая
Hb S	не устойчив	2,9	7,09	очень малая	нормальная

Hb S и кристаллизация редуцированной формы его в эритроцитах является причиной появления серповидности последних. Эта аномалия не влечет за собой расстройства ферментных систем в эритроцитах, но приводит к уменьшению проницаемости эритроцитов по отношению к фосфатам и фосфатным эфирам. Такое состояние приводит к торможению метаболических процессов и снижению резистентности эритроцитов к гемолизирующим факторам.

Анемия Кули (средиземноморская анемия, *thalassaemia major*) и диатез Кули (*thalassaemia minor*) протекают, как и серповидноклеточная анемия, со снижением осмотической резистентности и сокращением длительности жизни эритроцитов. При этих заболеваниях в эритроцитах имеется до 40% эмбрионального гемоглобина F. Этот тип гемоглобина в эритроцитах здоровых новорожденных составляет 80% всего гемоглобина. В течение первых месяцев жизни гемоглобин типа A замещает гемоглобин типа F так, что у 4 месячного ребенка Hb F составляет всего 10%, а у годовалого ребенка имеются лишь следы (0,3—0,4%) эмбрионального гемоглобина. Как при гемозиготной форме анемии с тяжелым течением и плохим прогнозом, так и при гетерозиготной форме (*thalassaemia minor*) вероятно не угасает полностью активность фермента, ответственного за продукцию щелочноустойчивого Hb F. Однако анемия и диатез Кули вероятно вызваны не геном, ответственным за синтез разных видов гемоглобина, а каким-то другим геном. Механизм появления Hb F при этих заболеваниях объясняется вторичным действием гена анемии на синтез нормального гемоглобина Hb A, а в результате физиологической компенсации у взрослого человека вырабатывается эмбриональный гемоглобин.

МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИЯ

Эта патология наследуется вероятно по рецессивному типу и заключается в наличии в эритроцитах метгемоглобина в количествах, достигающих до 45% всего гемоглобина. Эритроциты здорового человека содержат примерно 0,1—1,0% этого пигмента, а равновесие $\text{Hb} \rightleftharpoons \text{Met Hb}$ контролирует ферментная система, редуцирующая метгемоглобин в эритроците (рисунок 82). Редукция метгемоглобина зависит от редуцированного НАД·H₂, причем

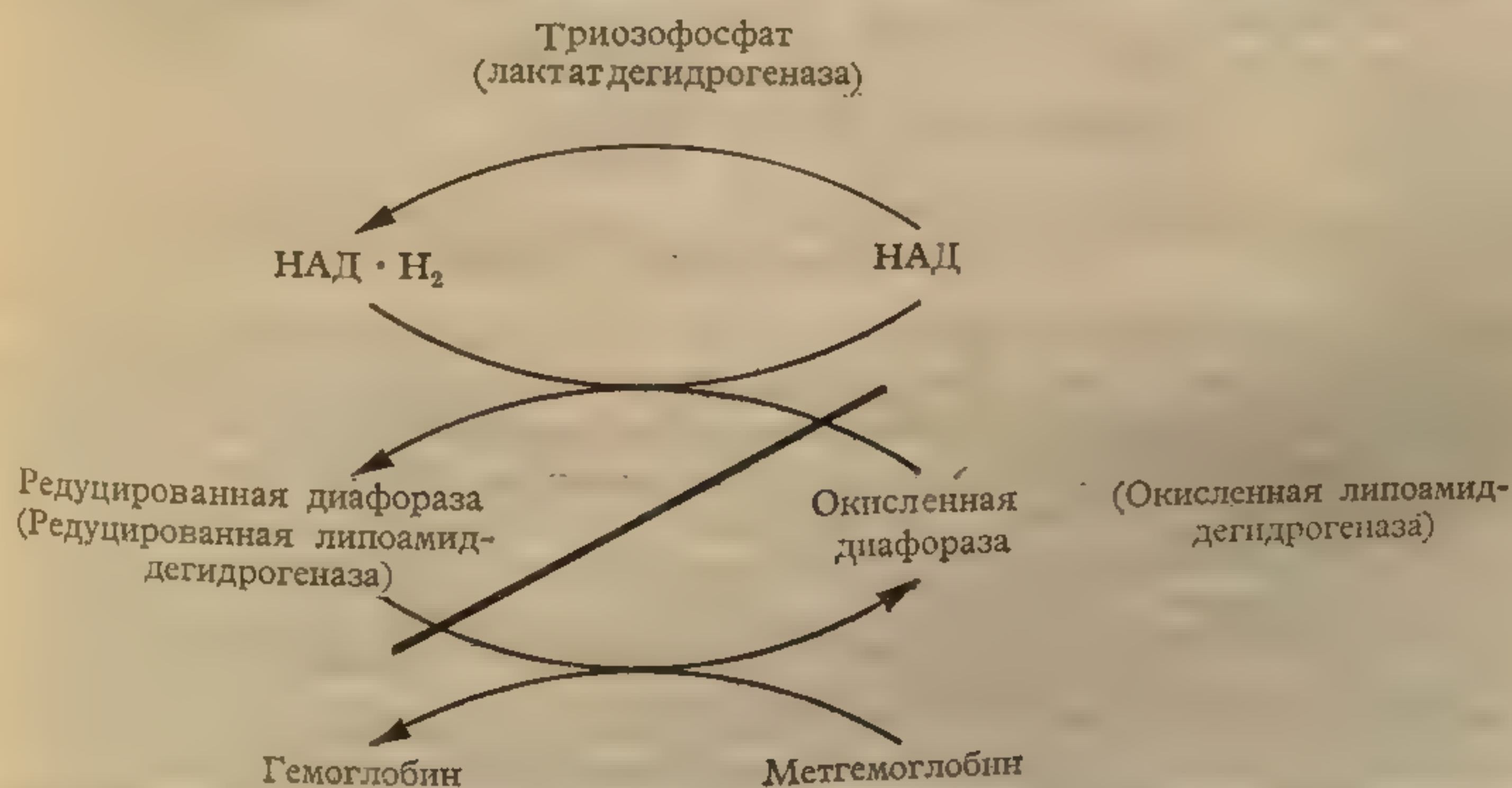


Рис. 82. Система, редуцирующая метгемоглобин в человеческих эритроцитах и метаболическая ее блокада при врожденной метгемоглобинемии.

ферментом, посредничающим между НАД и метгемоглобином, является диафораза (липоамиддегидрогеназа). Врожденная метгемоглобинемия вызвана резким снижением активности этого фермента.

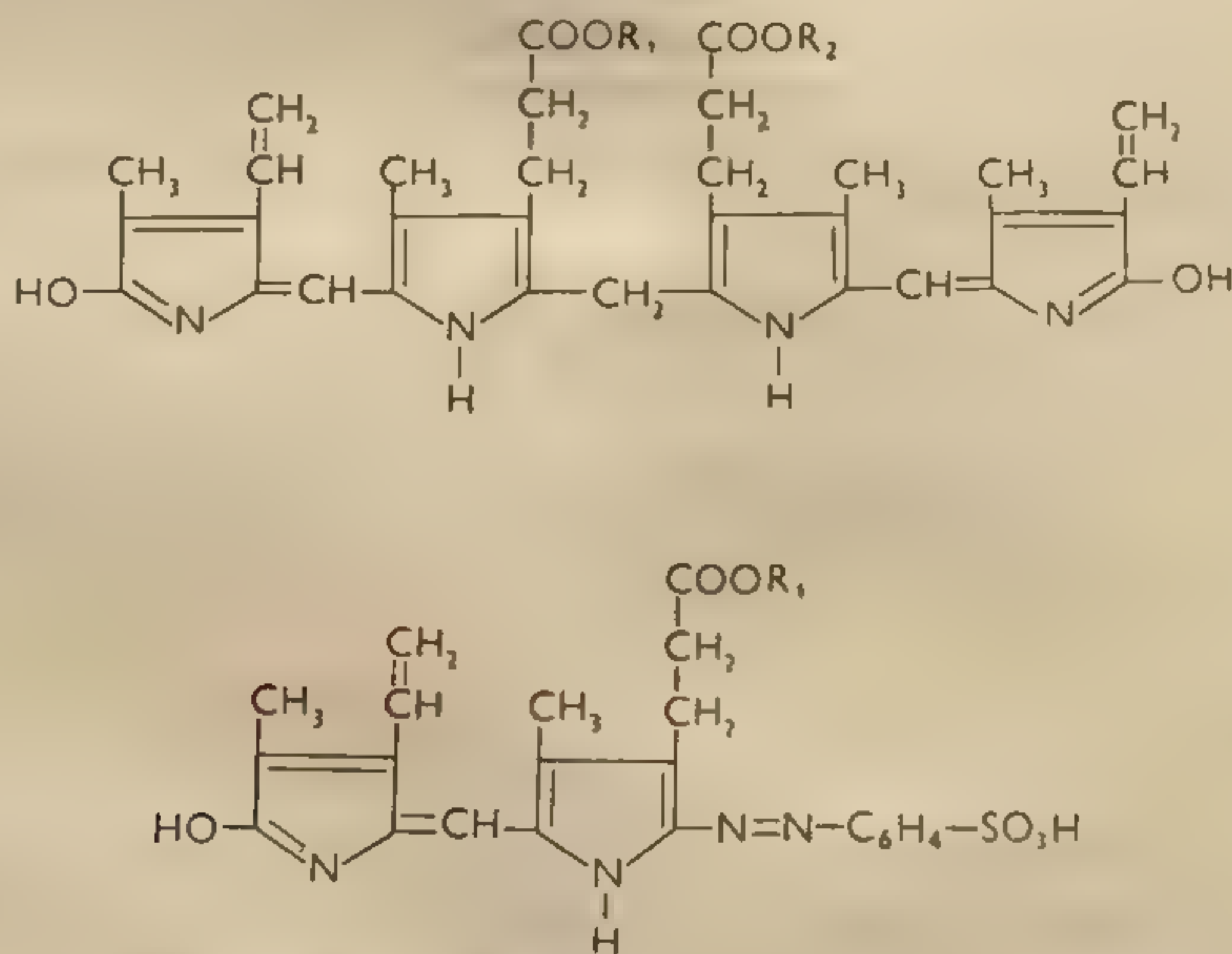
Течение болезни доброкачественное. В большинстве случаев оно не вызывает жалоб больного и кроме цианоза не дает других клинических симптомов.

Иногда появляется одышка при физической нагрузке (*dyspnoe*) с компенсаторной полицитемией. Кривая диссоциации оксигемоглобина смещена влево, что значит, что при данном парциальном давлении кислорода, отщепление его от оксигемоглобина в смеси с метгемоглобином происходит с большим трудом, чем в растворах одного оксигемоглобина.

Больные обычно хорошо реагируют на лечение большими дозами аскорбиновой кислоты (до 500 мг в сутки) и метиленовой синькой.

ОБМЕН ЖЕЛЧНЫХ ПИГМЕНТОВ

Билирубин, возникающий в ретикуло-эндотелиальной системе, перемещается с белками крови в свободном состоянии в печеночные клетки, где основным направлением его обмена является соединение с глюкуроновой кислотой. В этом виде билирубин выделяется с желчью, или, при трудностях в оттоке желчи, попадает в кровь и мочу. Соединение билирубина с глюкуроновой кислотой изменяет физико-химические свойства этого пигмента и прежде всего растворимость. Из соединения, которое в свободном состоянии переходит в раствор только в органических растворителях, оно превращается в соединение, растворимое в воде. В этом процессе билирубин соединяется с глюкуроновой кислотой путем карбоксильной группы, причем глюкуроновая кислота может заменить один или оба атома водорода свободных карбоксильных групп (пигмент I и II) (19, 73).



Структурные формулы билирубина и диазопиролового пигмента

Если R_1 и R_2 являются атомами водорода, то тетрапироловая система является свободным билирубином. В этом случае в реакции с п-диазо-бензосульфоновой кислотой образуются две молекулы незтерифицированного диазопиролового пигмента (пигмент А). Если R_1 или R_2 обозначают глюкуроновую кислоту, то тетрапироловое соединение является моноглюкуронатом билирубина (пигмент I), из которого при диазореакции образуется одна молекула пигмента А и одна молекула пигмента В, то есть диазопиролглюкуроната. В том случае, когда R_1 и R_2 являются молекулами глюкуроновой кислоты, образовавшееся соединение является билирубиндиглюкуронатом (пигмент II). При реакции Ван ден Берга из него образуются две молекулы пигмента В (2).

Физикохимические различия между свободным билирубином и глюкуронатом билирубина являются также причиной проявления так называемой прямой и не прямой реакции Ван ден Берга. Нерастворимый в воде свободный билирубин дает с п-диазобензо-сульфовым реактивом не прямую реакцию с образованием так называемого пигмента А, а глюкуронат билирубина дает прямую реакцию с образованием пигмента В (18, 20, 70, 71, 85). Механизм преобразований, приводящих к образованию глюкуроната билирубина, является комплексным циклом, течение которого иллюстрирует рисунок 83 (2, 17).

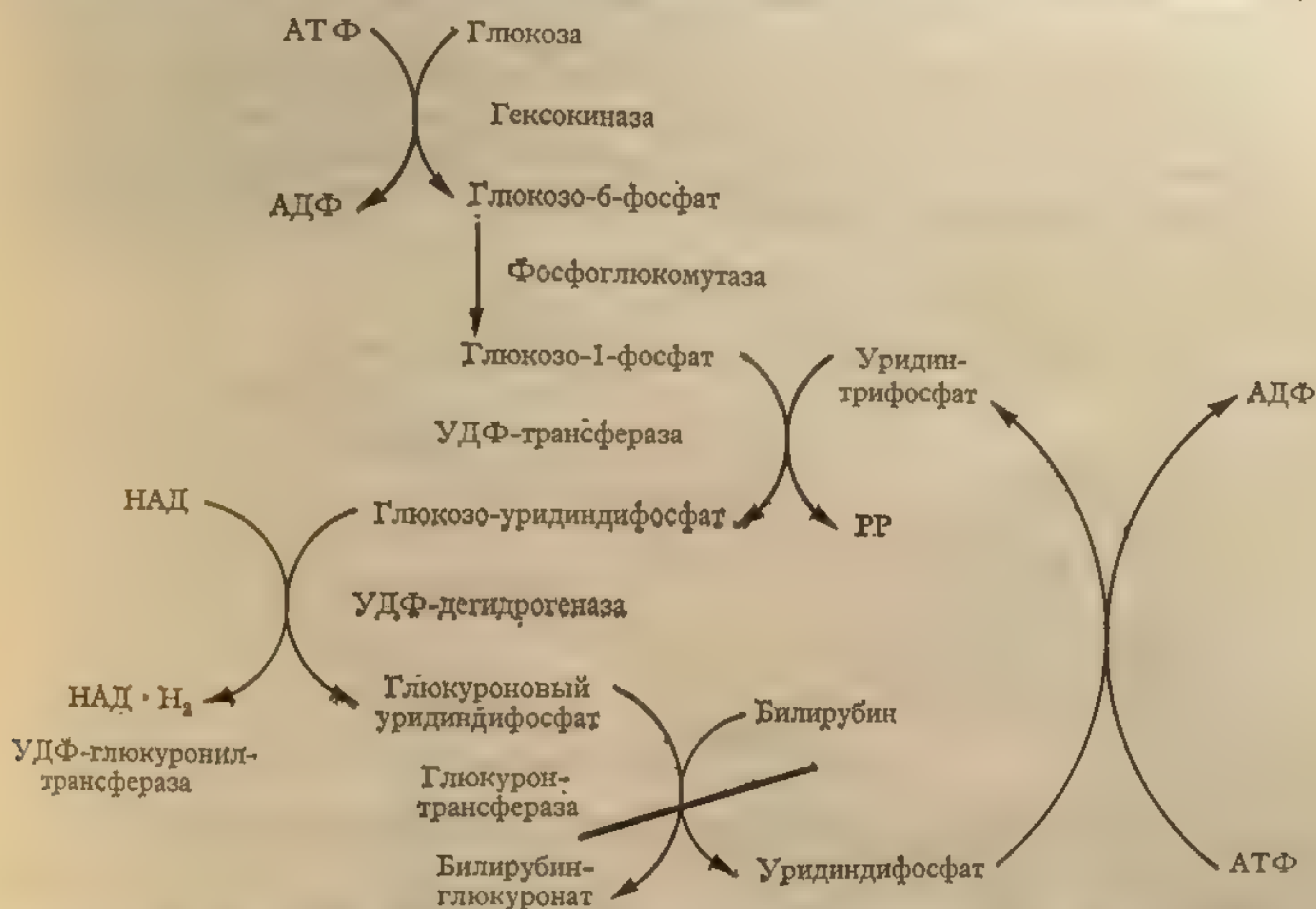


Рис. 83. Вероятный механизм соединения билирубина с глюкуроновой кислотой и ферментная блокада при болезни Gilbert.

Болезнь Gilbert является единственным врожденным ферментным расстройством при преобращении желчных пигментов в глюкуронат билирубина. Эта аномалия проявляется периодической желтухой с ростом уровня свободного билирубина в плазме, дающего не прямую реакцию Ван ден Берга. Механизм этого нетяжелого осложнения заключается в блокаде глюкуронаттрансферазы (УДФ-глюкуронаттрансферазы), переносящей глюкуроновую кислоту с уридин-дифосфо-глюкуроната на свободный билирубин (3, 72). Снижение активности этого фермента, который обычно имеется в микросомах печеночных клеток, влечет за собой потерю способности синтеза растворимого в воде глюкуроната билирубина.

АКАТАЛАЗИЯ

Механизм наследования этой редкой аномалии невозможно окончательно установить на основании описанных до настоящего времени случаев. Клинически акаталазия проявляется некротическими язвами в ротовой полости, особенно в области десен, которые прогрессируют, охватывая кости. Удаление зубов задерживает патологический процесс (84). Изъязвления слизистой оболочки ротовой полости объясняются отсутствием каталазы, разлагающей

H_2O_2 , образуемой имеющимися на слизистой оболочке стрептококками. При отсутствии каталазы перекись водорода через мелкие повреждения слизистой оболочки попадает в кровь и окисляет гемоглобин, который в результате этого теряет способность к переносу кислорода. В этих условиях наступает некроз тканей и дальнейшее развитие на некротических тканях бактериальной флоры. В случаях акаталазии установлено, что каталазы нет в крови, костном мозге, печени, и мышцах (57). Вероятно все ткани лишены этого фермента.

ПУРИНОВЫЙ ОБМЕН

Ферментные дефекты пуринового обмена касаются метаболизма мочевой кислоты. Это соединение является окончательным продуктом окисления пуриновых оснований и независимо от этого синтезируется эндогенно из глицина, аммиака, муравьиной кислоты и двуокиси углерода. Суточная про-

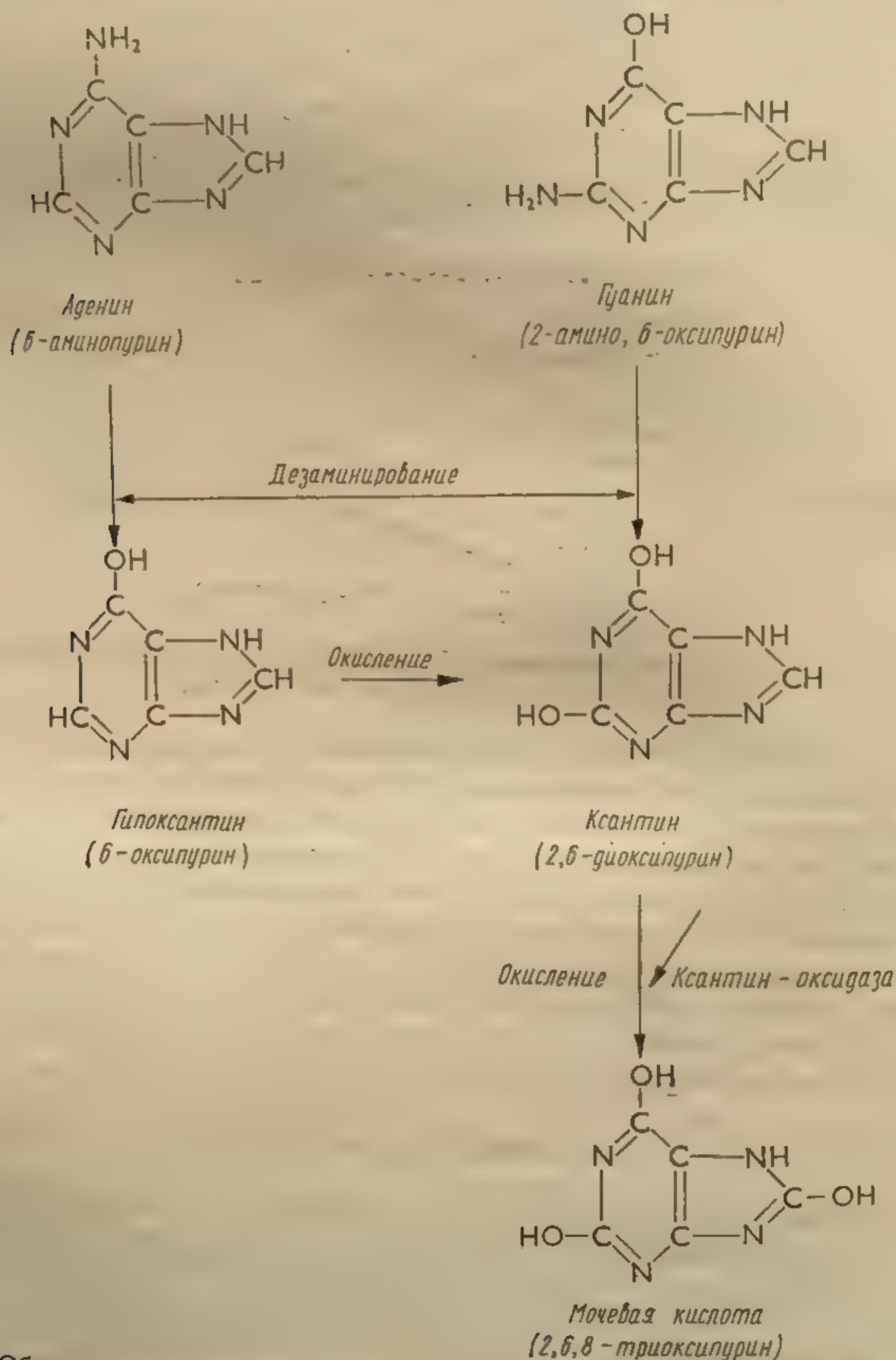


Рис. 84. Обмен пуриновых оснований и метаболическая блокада при ксантинурии.

дукция мочевой кислоты равна примерно 600 мг, из них примерно 100 мг образуется в процессе обмена пуриновых оснований, остальная часть — в процессе эндогенного синтеза. На пути обмена от пуриновых оснований до мочевой кислоты единственной врожденной аномалией является так называемая ксантинурия. Усиленный синтез мочевой кислоты из непуриновых источников приводит к расстройству, известному под названием гиперурикемии.

Ксантинурия — очень редкая врожденная аномалия. Заключается она вероятно в угасании функции ксантиноксидазы, катализирующей окисление ксантина до мочевой кислоты (рисунок 84). Результатом этого расстройства является торможение процесса окисления пуриновых оснований на уровне ксантина, который выделяется с мочой. Ксантин еще более трудно растворим, чем мочевая кислота, поэтому дело легко доходит до образования почечных камней. Ввиду того, что этой аномалии не сопутствует гиперксантинемия, возможно, что заболевание заключается в избирательной проницаемости почек

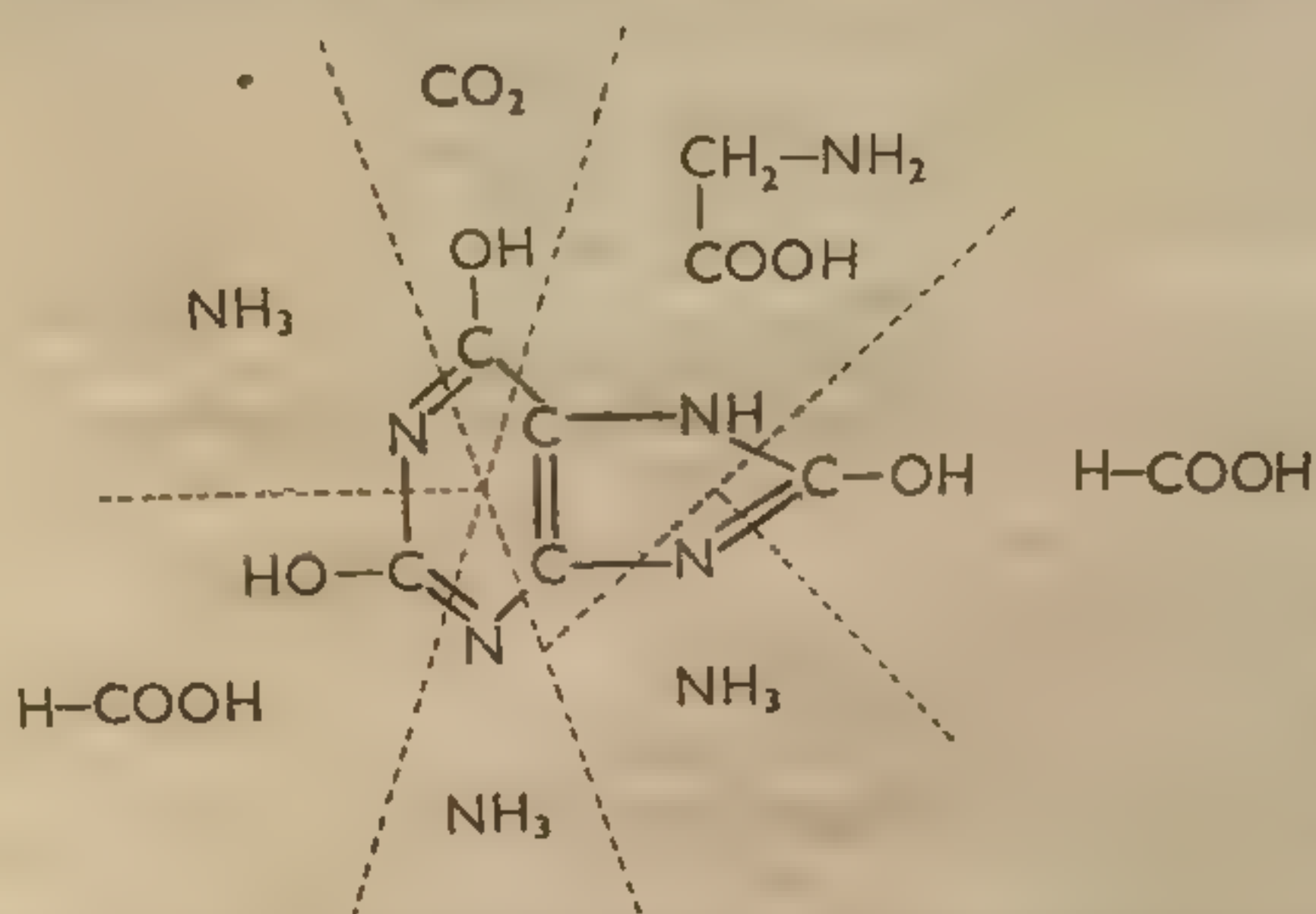


Рис. 85. Предшественники мочевой кислоты в эндогенном синтезе.

для ксантина, а не в блокаде ксантиноксидазы. Согласно этому предположению ксантин так быстро удаляется почками, что не успевает окисляться в печени (27).

Гиперурикемия — аномалия, наследуемая вероятно как доминирующий аутосомный признак. Проявляется она увеличением уровня мочевой кислоты в крови, который превышает 6 мг%. Механизм расстройства заключается в усилении синтеза мочевой кислоты из его непуриновых предшественников (рисунок 85).

Такое состояние может послужить причиной подагры (мочекислотного артрита). Хотя многие случаи заболевания протекают без отложения мочевой кислоты, последняя является главным этиологическим фактором „первичного мочекислотного артрита“. Мужчины гораздо чаще страдают этой патологией, чем женщины. Причина этого явления неизвестна. Предположения о том, что существует корреляция между сниженным уровнем 17-кетостероидов и появлением приступов подагры (91) не подтвердились в более поздних исследованиях (22). Совершенно неизвестен механизм появления симптомов подагрических приступов а также факторов, приводящих к переходу от бессимптомно протекающей гиперурикемии в клиническую форму подагры. Возможно, однако, что у истоков обоих расстройств лежит тот же самый генетический дефект, а появление клинических форм подагры, которым предшествовала гиперурикемия, вызвано неизвестными до настоящего времени экзогенными факторами.

ДРУГИЕ РЕДКИЕ ФЕРМЕНТОПАТИИ

Гипофосфатазия является расстройством, заключающимся в резком снижении или полном выпадении активности щелочной фосфатазы в плазме и во всех органах организма. Уровень фосфатов в плазме обычно остается нормальным но среди этерифицированных фосфатных фракций имеется коламинфосфат, который не встречается у здоровых и при других заболеваниях (37). Уровень кальция обычно повышен. Клинически заболевание проявляется вскоре после рождения тяжелыми симптомами рахита, совершенно неподдающимися лечению витамином D. Преходящего улучшения рахитических симптомов можно добиться, применяя очень большие дозы кортизона (38). Это заболевание всегда кончается смертельным исходом.

Оксалоз. Источником эндогенно образующейся щавелевой кислоты в организме человека является прежде всего глицин, из которого она может образовываться на пути обмена, представленном на рисунке 86.

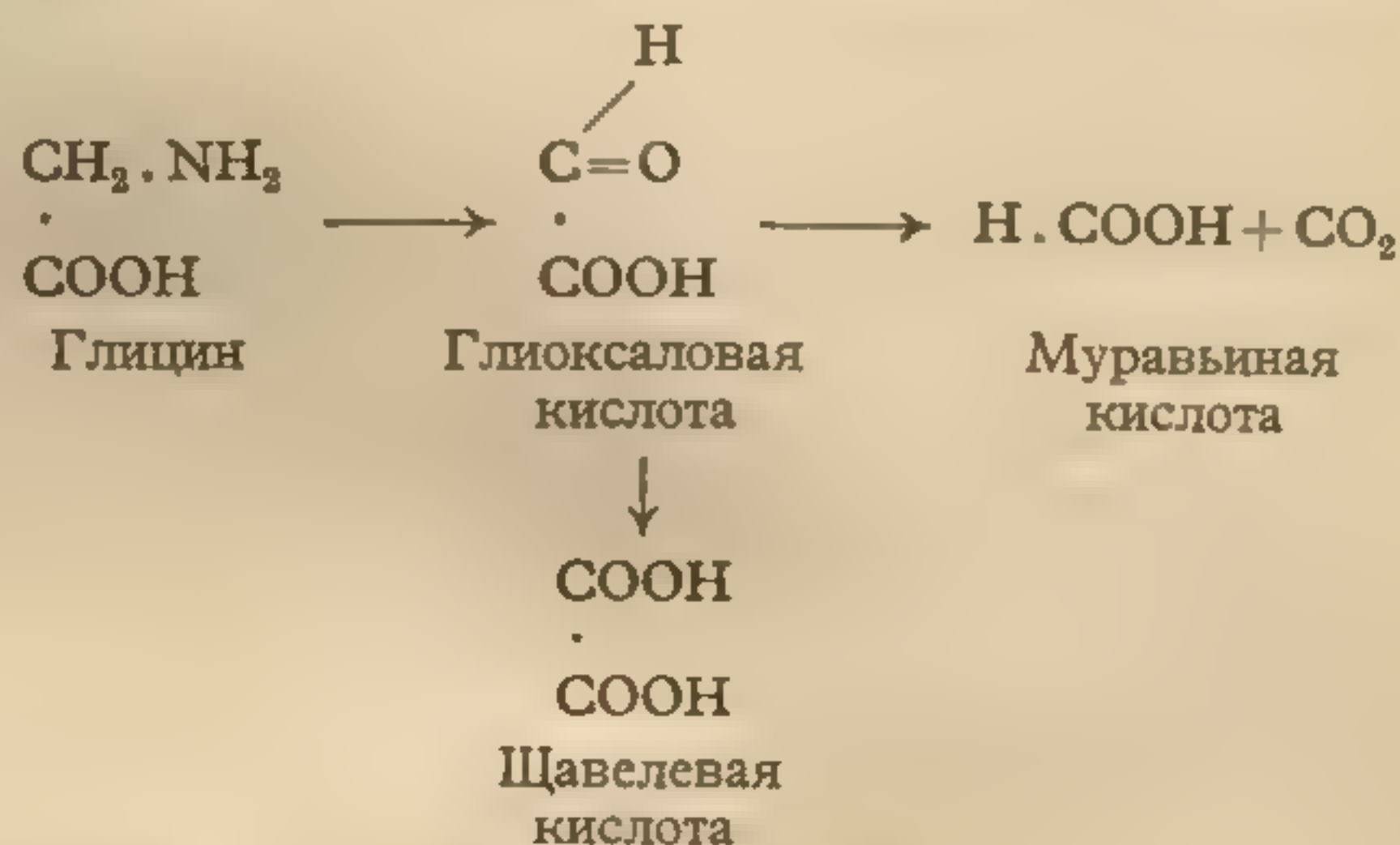


Рис. 86. Пути превращения глицина в муравьиную и щавелевую кислоту и метаболическая блокада этого процесса при врожденном оксалозе.

В физиологических условиях окисление глиоксальной кислоты приводит обычно к образованию муравьиной кислоты и CO_2 . В случае оксалоза это направление метаболизма вероятно блокируется и глиоксальная кислота окисляется исключительно до щавелевой кислоты. Вырабатываемая в избыточном количестве щавелевая кислота отлагается в разных органах в виде оксалата кальция. Может произойти закупорка почечных канальцев, что в свою очередь влечет за собой затруднение выделения мочи. Заболевание кончается смертельным исходом при симптомах уремии.

Гиперфосфатурия клинически проявляется рахитическими симптомами, как и при гипофосфатазии, не поддающимися лечению витамином D. Причиной заболевания является расстройство реабсорбции фосфатов из почечных канальцев, в результате чего уровень этих соединений в моче очень высок, а в крови снижен.

На основании малочисленных сообщений невозможно установить механизм этих очень редко встречающихся ферментопатий.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abderhalden R.*: Klinische Enzymologie. Georg Thieme verl. Stuttgart 1958. — 2. *Arias J. N.*: Adv. in Clin. Chem. 1960, 3, 35. — 3. *Arias J. M., London I. M.*: Science, 1957, 126, 563. — 4. *Armstrong M. D., Tyler F. H.*: J. Clin. Invest. 1955, 34, 565. — 5. *Baldwin E.*: Dynamic Aspects of Biochemistry. At The University Press. Cambridge, 1957. — 6. *Barandun S. H., Huser J.*,

- Hassig A.: Schweiz. Med. Wschr. 1958, 88, 78. — 7. Barr D. P., Rotbard S., Eder H. A.: J. Amer. Med. Ass. 1954, 156, 943. — 8. Bickel H., Gerrard J., Hickmans E. M.: Acta Paediatr. 1954, 43, 64. — 9. Bickel H., Grüter W.: Ztschr. Kinderheilk. 1957, 79, 509. — 10. Biggs R.: Nature, 1952, 170, 280.
11. Biggs R., Douglas A. S.: J. Clin. Pathol. 1953a, 6, 15. — 12. Biggs R., Douglas A. S.: J. Clin. Pathol. 1953b, 6, 23. — 13. Biggs R., Douglas A. S., Macfarlane R. G.: J. Physiol. 1953a, 119, 89. — 14. Biggs R., Douglas A. S., Macfarlane R. G.: J. Physiol. 1953b, 122, 538. — 15. Biggs R., Douglas A. S., Macfarlane R. G.: J. Physiol. 1953b, 122, 554. — 16. Bilikiewicz T.: Psychiatria kliniczna. PZWL Warszawa 1960. — 17. Billing B. H.: Adv. in Clin. Chem. 1959, 2. — 18. Billing B. H., Cole P. G., Lathe G. H.: Biochem. J. 1957, 65, 774. — 19. Billing B. H., Lathe G. H.: Bioch. J. 1956, 63, 6. — 20. Billing B. H., Lathe G. H.: Am. J. Med. 1958, 24, 111.
21. Bürger M.: Einführung in die Pathologische Physiologie. Georg Thieme Verl. Leipzig. 1956. — 22. Butt W. R., Marson F. G.: Brit. Med. J. 1952, 2, 1023. — 23. Callender S. T., O'Brien J. R. P.: The anaemias. Biochemical Disorders in Human Disease. J. et A. Churchill Ltd. London, 1957. — 24. Carson P. E.: Feder. Proc. 1960, 4, 971. — 25. Chambers R. A., Pratt R. T. C.: Lancet, 1956/II, 340. — 26. Coates S., Norman A. P., Woolf L. J.: Arch. Dis. Childh. 1957, 32, 313. — 27. Dent C. E., Philpot G. R.: Lancet, 1954/II, 182. — 28. Dent C. E., Rose G. A.: Quart. J. Med. 1951, 20, 205. — 29. Deuel H. J. Jr.: The Lipids. Vol. II. Interscience Publ. Inc. New York—London, 1955. — 30. Dobroszycka W.: Post. Hig. i Med. Dośw. 1958, 12, 365.
31. Dresel E. J. B.: The role of some porphyrins and porphyria precursors in the biosynthesis of haem. Ciba Foundation Symp. on Porphyrine Biosynthesis and Metabolism. J. et A. Churchill. London. 1956. — 32. Falk J. E., Dresel E. J. B., Rimington C.: Nature, 1953, 172, 292. — 33. Feldberg W., Talesnik J.: J. Physiol. 1953, 120, 550. — 34. Felix K.: Ztschr. Physiol. Chemie. 1944, 281, 36. — 35. Folling A.: Ztschr. Physiol. Chemie, 1934, 227, 169. — 36. Frankel G. J., Honey G. E.: Lancet, 1955/II, 1117. — 37. Fraser D., Yendt E. R., Christie H. E.: Lancet, 1955/I, 286. — 38. Fraser D., Laidlaw J. C.: Lancet, 1956/I, 553. — 39. Froesch E. R., Prader A., Labhart A., Stuber H. W., Wolf H. P.: Schweiz. Med. Wschr. 1957, 87, 1168. — 40. Garrod A. E.: Lancet, 1908/II, 1, 73, 142, 214.
41. Garrod A. E.: Inborn Errors of Metabolism. H. Froude, Hodder et Stoughton. London, 1923. — 42. Gibson K. D.: Some Properties of delta-Aminolevulinic Acid Dehydrase. Ciba Foundation Symp. on Porphyrine Biosynthesis and Metabolism. J. et A. Churchill. London. 1956. — 43. Gray C. H.: Porphyrins. Biochemical Disorders in Human Disease. J. et A. Churchill Ltd. London, 1957. — 44. Greiling H.: Klin. Wschr. 1957, 35, 889. — 45. Haldane J. B. S.: Biochemia genetyki. Państw. Wyd. Roln. i Leśne Warszawa, 1960. — 46. Hansen R. G., Freedland R. A., Scott H. M.: J. Biol. Chem. 1956, 219, 391. — 47. Harris H.: Some Abnormalities of Amino Acid and Haemoglobin Metabolism. Biochemical Disorders in Human Disease. J. et A. Churchill Ltd. London, 1957. — 48. Hiatt H. H.: Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 645. — 49. Horner F. A., Streamer C. W.: J. Amer. Med. Ass. 1956, 161, 1628. — 50. Horner F. A., Streamer C. W., Clader D., Hassel L. L., Binkley E. L., Dumars K. W.: Amer. J. Dis. Child. 1957, 93, 615.
51. Hudson F. P., Ireland J. T., Ockenden B. G., White-Jones R. H.: Brit. Med. J. 1954/I, 242. — 52. Ingram V. M.: Nature, 1956, 178, 792. — 53. Jervis G. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950, 75, 83. — 54. Jervis G. A.: Arch. Neurol. Psychiatr. 1937, 38, 944. — 55. Kalckar H. N.: Fed. Proc. 1960, 19, 984. — 56. Kalckar H. N., Anderson E. P., Isselbacher K. J.: Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20, 262. — 57. Kaziro K., Kikuchi G., Nakamura H., Yoshiya M.: Chem. Ber. 1952, 85, 886. — 58. Knox W. E.: Am. J. Human Genetics, 1958, 10, 3, 95, 249, 385. — 59. Knox W. E.: The Hereditary Molecular Diseases. Enzymes in Health and Disease. Charles C. Thomas Publ. Springfield. U. S. A. 1960. — 60. Larner J.: Feder. Proc. 1960, 19, 971.
61. Lerner A. B.: Adv. in Enzymol. 1953, 14, 73. — 62. Leuthardt F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie. Walter de Gruyter et Co. Berlin, 1955. — 63. Macfarlane R. G., Biggs R., Bidwell E.: Lancet, 1954/I, 1316. — 64. Muir H. M., Neuberger A.: Biochem. J. 1950, 47, 97. — 65. Neuberger A.: Ann. Rev. of Biochem. 1949, 18, 243. — 66. Neuberger A., Scott J. J.: Nature, 1953, 172, 1093. — 67. Opińska-Blauth J.: Post. Bioch. 1961, 7, 83. — 68. Pauling L.: Harvey Lect. 1954, 49, 216. — 69. Pauling L., Itano H. A., Singer S., Wells I. C.: Science, 1949, 110, 543. — 70. Schmid R.: Science, 1956, 124, 76.
71. Schmid R.: J. Biol. Chem. 1957, 229, 881. — 72. Schmid R.: J. Clin. Invest. 1957, 36, 927. — 73. Schmid R., Hamaker L., Axelrod J.: Arch. Biochem. Biophys. 1957, 70, 285. — 74. Schwartz M. A., Williams Jr. J. N.: J. Biol. Chem. 1952, 197, 481. — 75. Schwarz V., Goldberg L.: Biochim. Biophys. Acta, 1955, 18, 310. — 76. Shemin D.: The succinate — glycine cycle: the role of delta-aminolevulinic acid in porphyrin synthesis. Ciba Foundation on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism. J. et A. Churchill Ltd. London, 1956. — 77. Shemin D., Russel C. S.: J. Amer. Chem. Soc. 1953, 75, 4873. — 78. Smith I.: Chromatographic Techniques. William Heinemann — Medical Books Ltd. London, 1958. — 79. Smith D. R., Kolb F. O., Harper H. A.: J. Urol. 1959, 71, 61. — 80. Stein W. H.: J. Biol. Chem. 1953, 201, 45.
81. Stein W. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. 1951, 78, 705. — 82. Stein W. H., Bearn A. G., Moore S.: J. Clin. Invest. 1954, 33, 410. — 83. Stein W. H., Moore S.: J. Biol. Chem. 1954, 211, 915. — 84. Takahara S.: Lancet, 1952/II, 1101. — 85. Talafant E.: Nature, 1956, 178, 312. — 86. Than-

- hauser S. J.: Lipidoses. Biochemical Disorders in Human Disease. J. et A. Churchill. London, 1957. — 87. Touster O.: Feder. Proc. 1960, 19, 977. — 88. Touster O., Harwell S. O.: J. Biol. Chem. 1958, 230, 1031. — 89. Vanotti A.: Porphyrrias. Hilger and Watts Ltd. London, 1954. — 90. De Vries A., Kochwa S., Lazebnik J., Frank M., Djaldetti M.: Amer. J. Med. 1957, 23, 408. — 91. Wolfson W. Q., Gutterman H. S., Levine R., Cohn C., Hutt H. D., Rosenberg E. F.: J. Clin. Endocrinol. 1949, 9, 457. — 92. Woolf L. J., Griffiths R., Moncrieff A.: Brit. Med. J. 1955, I, 57. — 93. Wyngarden J. B., Crawford T. D., Chamberlin H. R., Lever W. F.: Pediatrics, 1952, 9, 729.

Ф

П
уже
пом
оп
мест
веку
про
дл
экст
мен
шир
хим
опт
при
что
тям
Ф
чащ
того
под
под
прек
счет
отно
мист
О
клет
не
чен
ван
удал
тела
обле
субс
боле
внут
внут
прим
кам
свой

ЧЕТВЕРТАЯ ЧАСТЬ

Ф Е Р М Е Н Т О Т Е Р А П И Я

FRANCISZEK KOKOT, STANISŁAW NOWAK

ВВЕДЕНИЕ

Попытки применения ферментов с терапевтической целью производились уже давно. Еще в VIII веке пытались ускорить заживление изъязвлений при помощи желудочного сока. Вскоре после того, как Шванн открыл пепсин, он был использован в 1834 г при лечении диспепсии, а затем применен для местного лечения гнойников и трудно заживающих изъязвлений. К прошлому веку относятся первые сообщения о терапевтическом применении других протеолитических ферментов, как папаина и трипсина. Уже издавна производились попытки терапии некоторых заболеваний желудочнокишечного тракта экстрактами поджелудочной железы, содержащими пищеварительные ферменты. Однако лишь в последнем десятилетии ферментотерапия нашла более широкое применение. Несомненно, этому способствовали достижения биохимии в выделении и очистке ферментов, а также в изучении условий их оптимального действия. Возможно, что относительно небольшое время применения ферментов в терапевтических целях является причиной того, что критическая оценка достигнутых результатов встречается с трудностями.

Ферменты как правило применяются в качестве вспомогательных средств, чаще всего параллельно с другими лекарственными препаратами. Ввиду того, что в большинстве статей не приведены результаты в соответственно подобранной контрольной группе, выводы авторов иногда приходится брать под сомнение. С другой стороны появляются предостерегающие голоса преимущественно в связи с осложнениями, часть которых можно отнести за счет использования недостаточно очищенных ферментов. Поэтому следует относиться с осторожностью как к оптимистическим голосам, так и к пессимистическим, встречающимся в медицинской литературе.

Огромное большинство биохимических процессов происходит внутри клеток, куда экзогенные ферменты, как крупномолекулярные соединения, не имеют доступа. Это приводит к тому, что ферментотерапия имеет ограниченное применение. Кроме заместительной терапии при некоторых заболеваниях желудочно-кишечного тракта, ферменты нашли применение для удаления некротических тканей, растворения скоплений фибрина в полостях тела и даже кровеносных сосудах, разжижения отделяемого а также для облегчения проникновения лекарственных веществ через межклеточную субстанцию. Новейшие данные не подтверждают правильности результатов более старых исследований о проникании введенного внутривенно цитохрома С внутрь клеток, а эффективность этого лекарства взята под сомнение. На внутриклеточные биохимические процессы мы можем оказать влияние путем применения низкомолекулярных субстанций, являющихся предшественниками активных групп ферментов, или их антагонистами, или же обладающих свойствами активаторов или ингибиторов ферментов.

Выделение витаминов, установление связи между дефицитом их и некоторыми заболеваниями, а также обнаружение участия их в некоторых ферментативных процессах в качестве коферментов, послужило основанием для витаминотерапии. В настоящее время широко применяются большие дозы витаминов при различных заболеваниях, которые не связаны с их дефицитом, даже если учитывать возможность значительного различия в потребности в витаминах при различных патологических состояниях, что нам кажется не совсем обоснованным. Доставка избыточного количества предшественников ферментов не стимулирует организм к усиленной их продукции.

С терапевтической целью используются также антиметаболиты некоторых витаминов, то есть антивитамины. Здесь прежде всего следует назвать антагонист витамина К, дикумарол, а также его производные, которые нашли применение в лечении внутрисосудистых тромбозов. Аминоптерин, антагонист фолиевой кислоты, затрудняет синтез пуриновых и пиримидиновых оснований, и таким образом тормозит размножение опухолевых клеток. В практике аминоптерин приобрел определенное значение в лечении некоторых форм лейкозов. Производились попытки использования в терапии новообразований антагонистов пироксина: 4-дезоксипиридоксина. Этот препарат, однако, давал серьезные побочные симптомы и поэтому не нашел более широкого применения в практике. Случайно обнаружено, что сульфонамиды обладают антивитаминными свойствами (по отношению к парааминобензойной кислоте, фактору, необходимому для роста многих бактерий). Также лекарственные препараты, применяемые для лечения малярии, оказались антагонистами витамина В₂. Однако неизвестно, зависит ли лечебный эффект в этих случаях от конкурентного вытеснения рибофлавина; другие антиметаболиты этого витамина не обладают противомаларийным действием. Abderhalden считает, что имеются данные для предположения, что поиски антивитаминов как бактериостатических препаратов могут в будущем увенчаться успехом. В пользу такого вывода говорят обнаруживаемое иногда значительное своеобразие в обмене веществ у микроорганизмов, а также различия в проницаемости клеточных оболочек, как и вообще большая чувствительность одноклеточных организмов к вредным факторам. Зато этот автор не ожидает, чтобы антиметаболиты сыграли значительную роль в лечении новообразований, так как в свете современных представлений не существует принципиального различия между ферментативными процессами в нормальной и опухолевой клетке.

Исследования последних лет механизма действия многих лекарственных препаратов, уже давно применяемых в практике, показали, что они оказывают влияние на активность ферментативных процессов. Примером могут служить наркотики. Они относятся преимущественно к субстанциям, растворимым в липидах, с чем раньше связывали их фармакологическое действие. В настоящее время пробуют объяснить их влияние торможением тканевых окислительных процессов и связанных с ними процессов фосфорилирования. К препаратам, разобщающим процессы фосфорилирования от окисления относят, например, салицилаты, динитрофенол, дикумарол. Препараты, возбуждающие холинергические окончания вегетативной нервной системы — простигмин и физостигмин — относятся к ингибиторам холинэстеразы.

Попытки повлиять на патологический процесс путем применения ингибиторов или активаторов ферментов содействовали обогащению арсенала лекарственных веществ, которым мы в настоящее время пользуемся в практике. Мы считаем, что дальнейшее изучение действия лекарственных препаратов

на ферментативные процессы облегчит в будущем как целесообразное их применение, так и фармакологические исследования. Можно ожидать, что огромное большинство лекарств оказывает влияние путем воздействия на процессы обмена, катализируемые ферментами. В главе о ферментотерапии будут рассмотрены лишь те препараты, терапевтический эффект которых тесно связан с ферментативным пунктом их воздействия.

ЗАМЕСТИТЕЛЬНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

В терапии некоторых заболеваний желудочно-кишечного тракта уже давно широко применяется пепсин и ферменты поджелудочной железы и прежде всего трипсин.

Пепсин преимущественно применяется в сочетании с соляной кислотой при пониженной кислотности желудочного сока и снижении его продукции. Для проявления протеолитической активности пепсина необходима кислая реакция желудочного содержимого. Пепсин, как и другие пищеварительные ферменты, выделяется обычно с большим избытком, поэтому уменьшение переваривающей способности желудочного сока при снижении его кислотности чаще всего является результатом недостаточной продукции свободной соляной кислоты. Основное значение при лечении этих состояний имеет стимуляция обкладочных клеток к выделению HCl , а применение пепсина имеет скорее второстепенное значение. При ахилии, когда следует считаться как с дефицитом свободной соляной кислоты, так и пепсина, обоснованным является применение этих обоих препаратов. Неудача в лечении может зависеть от недостаточной активности применяемых препаратов, а также от того, что нелегко добиться соответствующей кислотности желудочного содержимого.

Панкреатические ферменты легко подвергаются инактивации при соприкосновении с соляной кислотой желудочного сока. Мы считаем, что применяемые с терапевтической целью ферменты в значительной степени инактивируются еще перед тем, как они попадут в просвет тонкого кишечника. Применение капсул, которые растворяются лишь в двенадцатиперстной кишке, вызывает опасение, что они не растворятся в результате секреторной недостаточности поджелудочной железы.

ТРИПСИН

Трипсин является одним из ферментов, наиболее давно применяемых в терапии. Выделяемый поджелудочной железой как неактивный трипсиноген, он активируется в кишечнике под влиянием энтерокиназы. Он относится к эндопептидазам и расщепляет пептидные связи, образованные карбоксильной группой щелочных аминокислот. Оптимум его действия приходится при pH 8,0—9,0. Этот фермент не обладает антигенными свойствами.

В терапии используется его протеолитическое действие, а также случайно обнаруженное противовоспалительное действие.

Местно трипсин применяется в буферных растворах соответствующего pH . Этот фермент приводит к более быстрому очищению ран от некротических тканей и гноя, живые же клетки не поддаются его действию. В последнее время особенно при лечении гнойных процессов, трипсин применяют одновременно с антибиотиками. Многие авторы сообщают об успешном лечении трип-

снимом варикозных язв голеней (6), пролежней, гнояников, панарициев, трудно заживающих гнойных и туберкулезных свищей, ожогов II и III степени, а также хронического остеомиелита (3). Трипсин пробовали применять также местно при некоторых ларингологических заболеваниях (дифтерия, ангина, гнойное воспаление придаточных пазух носа), а также стоматологических (пародонтоз).

Этот фермент оказался эффективным при лечении гемоторакса и эмпиемы плевральной полости. Многие авторы считают, что трипсин действует сильнее, чем активированный стрептокиназой плазмин. Внутривенному введению трипсина могут сопутствовать побочные явления: головные боли, повышение температуры, рвоты. Очень важно опорожнять полости после растворения трипсином их содержимого (через 8—10 часов после введения препарата) (1).

При заболеваниях дыхательных путей трипсин применяется в виде аэрозолей. Показаниями к этому способу лечения являются: бронхоэктазы, абсцессы легких, гнойное воспаление придаточных пазух носа, кагары дыхательных путей, а прежде всего бронхиты. Трипсин, разжижая густое отделяемое, облегчает очищение бронхиального дерева и абсцессов легких от патологического содержимого (3).

Попытки внутривенного применения трипсина для растворения внутрисосудистых тромбов оказались безрезультатными. При этом обнаружено противовоспалительное действие этого фермента, чем объясняются положительные результаты при лечении тромбофлебитов (4). Согласно некоторым авторам трипсин при этом заболевании дает лучшие результаты, чем антикоагулянты (уменьшение легочных тромбозов, 1). Противовоспалительное действие трипсина в настоящее время используется путем применения его при ряде других заболеваний. Установлено также, что общее применение этого фермента усиливает местное действие трипсина, например, при лечении гнояников, и может заменить ферментные ингаляции при заболеваниях дыхательных путей.

Внутривенное введение, которому могут сопутствовать серьезные осложнения, вначале были вытеснены внутримышечным введением трипсина. В последнее время все чаще применяют трипсин в виде таблеток, растворимых в полости рта (откуда он всасывается в кровяное русло, 5, 7), или капсул, нерастворимых в желудочном соке (7).

Попытки применения трипсина при язвенной болезни, язвенном колите, инфекциях мочевых путей не дали удовлетворительного результата, или же сообщения о полученных результатах противоречивы.

При местном применении трипсина осложнений не наблюдалось, за исключением кратковременных локальных болей. Умеренные локальные боли сопутствуют также внутримышечным инъекциям. Таблетки, растворяющиеся в ротовой полости, кроме болей могут вызвать изъязвления слизистой оболочки рта. Выше мы уже указывали, что иногда появляются общие токсические реакции при лечении трипсином гемо- и пнотораксов. Ингаляциям также могут сопутствовать побочные явления: головные боли, повышение температуры, приступы острой одышки у астматиков. При внутривенном введении трипсина иногда наступают приливы крови к голове (*rash*). Следует также считаться с возможностью образования внутрисосудистых тромбов и анафилактических реакций после внутривенного введения фермента.

Противопоказанием к ингаляциям являются состояния после перенесенных недавно легочных кровотечений и тяжелая одышка. Ферменты нельзя вводить внутривенно при геморрагическом диатезе и недостаточности кровообращения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abderhalden R.*: Klinische Enzymologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1958. — 2. *Biron A., Choay L.*: Presse Méd. 1955, 63, 1007. — 3. *Fast J.*: Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 1075. — 4. *Fisher M. M., Wileńsky N. D.*: New York State J. Med., 1954, 54, 659. — 5. *Miller J. M., Ginsberg M., Elfabrick G. C., Saldana-Schmier R.*: Exp. Med. Surg. 1959, 17, 229. — 6. *Murphy H. L.*: J. Geront 1961, 16, 29. — 7. *Shubin H., Sherson J. S.*: Antibiot. Med. Clin. Ther. 1960, 7, 386.

α -ХИМОТРИПСИН

Химотрипсин является второй, наряду с трипсином, эндопептидазой, вырабатываемой поджелудочной железой. Выделяется он в неактивной форме и активируется трипсином. Оптимум действия находится при рН 8,0. Однако химотрипсин более стоек в кислой среде, чем трипсин. Химотрипсин гидролизует связи ароматических аминокислот.

В терапевтических целях используются как его протеолитические, так и противовоспалительные свойства. Химотрипсин применяется для очищения ран, особенно некротических и гнойных, при лечении гемо- и пнотораксов. Применяется также в виде аэрозолей при заболеваниях дыхательных путей. Противовоспалительные свойства химотрипсина пытались использовать прежде всего в пластической хирургии. Фермент вероятно уменьшает отеки и кровоизлияния в области раны, облегчает приживание трансплантатов и ускоряет образование рубца (1). Некоторые авторы, однако, не наблюдали такого действия этого фермента (2). Химотрипсин приводит также к уменьшению болей при „*periarthritus humero-scapularis*“ (4).

Химотрипсин вызывает большой интерес у окулистов. Случайно обнаруженное растворение связки хрусталика после введения фермента в переднюю камеру глаза, используется при операции по поводу катаракты. Благодаря „ферментному зонулолизу“ удастся удалять хрусталик внутри сумки, избегая разрыва ее и вытекания стекловидного тела (3, 4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Caluan J., Barr B.: Brit. Med. J. 1960, 2, 261. — 2. Dufurmental C., Monly R., Preaux J. R.: Presse Méd. 1960, 68, 213. — 3. Kapuściński W. J., Hańczyc P.: Klinika oczna 1960, 30, 21. — 4. Ravina A.: (Trypsine et chymothrypsine). Presse Méd. 1959, 67, 1782.

ТРОМБИН

Действие тромбина используется с терапевтической целью лишь при местном применении фермента. Он оказался полезным прежде всего при остановке кровотечений во время операций и послеоперационных. В нейрохирургии тромбин применяется при повреждении менингеальных синусов, при кровотечениях из опухолевой ткани или сосуда, которого не удастся перевязать. Положительные результаты получены при кровотечениях во время стру-маэктомии, а также при некоторых операциях на органах брюшной полости и других. Для облегчения удаления мелких камней при пиелотомии, реко-мендуется создать при помощи тромбина и раствора фибриногена сгусток внутри почечной лоханки (3).

Пытались также использовать тромбин, применяя его местно при желудочных кровотечениях (1, 4), кровотечениях из варикозно расширенных вен пищевода и при кровотечениях из толстого кишечника. Кислая реакция желудочного сока приводит к инактивации препаратов тромбина, поэтому при

лечения кровотечений из желудка и двенадцатиперстной кишки его дают вместе с буферными смесями или в молоке. При легочных кровотечениях тромбин применяется в виде аэрозолей для ингаляций (2).

Применение фибриновых пленок, образующихся при смешивании капли плазмы с тромбином, дает хорошие результаты при лечении конъюнктивитов и кератитов. Также и при ожогах II и III степени применение тромбина наряду с сульфонидами ускоряет заживление ран. Наконец, следует также напомнить о попытках лечения туберкулезных каверн путем „пломбирования“ их при помощи сгустка, образующегося после местного применения тромбина. Одновременно местно вводят хемотерапевтические препараты.

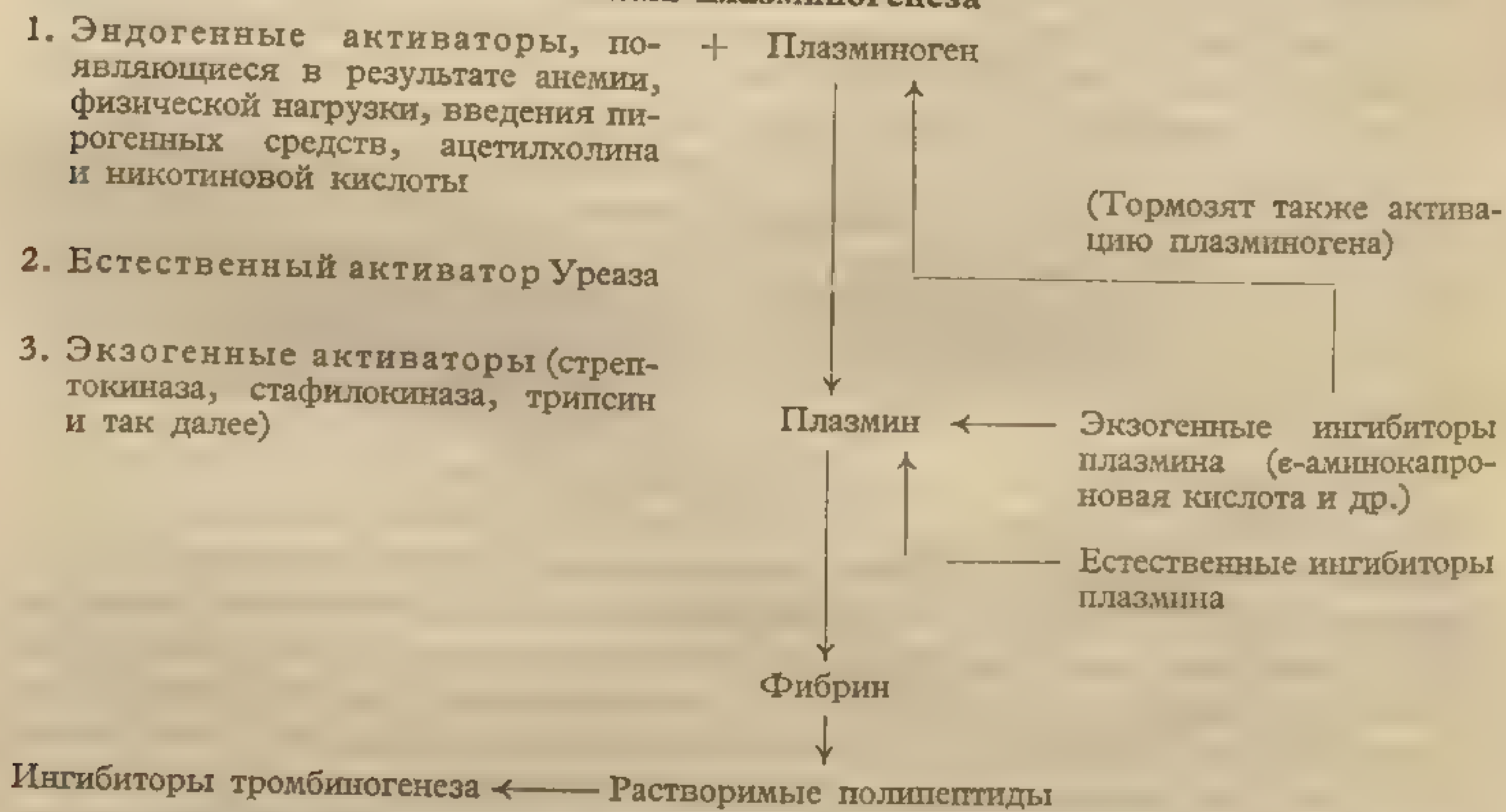
ЛИТЕРАТУРА

1. Baly B. M.: Arch. Surg., 1947, 55, 208. — 2. Euke H.: Therapie Gegenw., 1953, 93, 307. — 3. Stok H. G.: Zschr. Urol., 1959, 52, 610. — 4. Usteri C., Matter M., Koller F.: Schw. Med. Wschr. 1953, 83, 674.

ПЛАЗМИН

Исследования по применению плазмина с терапевтической целью начались после того, как Tillet и Sherry (34) заметили, что стрептокиназа, примененная внутриплеврально, активирует естественный фибринолиз, а также обладает способностью растворять сгустки крови в плевральной полости. В дальнейшем фибрино- и коагулолитическая терапия стала применяться для борьбы с тромбэмболическими заболеваниями у человека (3, 6, 8, 31).

Схема плазминогенеза



Для лучшего понимания механизмов, обуславливающих образование и действие плазмина, следует ознакомиться с приведенной схемой плазминогенеза (5, 13, 18, 20, 25, 28).

Плазмин может образоваться под влиянием действия эндогенных активаторов на плазминоген. Освобождение этих активаторов из тканей можно спровоцировать такими факторами, как физическая нагрузка, анемизация тканей, бактериальные пирогены, ацетилхолин, адреналин, и никотиновая кислота (11, 15,

21, 27, 30, 36). За исключением печени и плаценты, активаторы плазминогена можно экстрагировать почти из всех тканей и экскрементов организма (2, 29). Однако точное место их возникновения неизвестно. Особого внимания заслуживает естественный активатор плазминогена в моче — уреазы. О нем речь будет ниже, при изложении способов активации плазминогена с лечебной целью.

Среди экзогенных активаторов плазминогена следует в первую очередь назвать хорошо изученную стрептокиназу. Активация плазминогена в плазмин является протеолитическим процессом. Образующийся плазмин является протеолитическим ферментом по отношению к целому ряду белков (фибриноген, фибрин, фактор V, казеин, желатин и др.). Это отсутствие специфичности плазмينا по отношению к среде делает сходным его с трипсином, который обладает более сильным протеолитическим действием, чем плазмин.

В физиологических условиях, образующийся под влиянием различных факторов плазмин, немедленно инактивируется антиплазмином, содержащимся в большом количестве в крови. Количество антиплазмина в плазме так велико, что превосходит даже количество, которое было бы необходимо для инактивации плазмина, образовавшегося из всего имеющегося в крови плазминогена (29).

Сильным ингибитором как процесса активации плазминогена, так и самого плазмина, является ϵ -аминокапроновая кислота (1, 4). Плазмин, действуя на фибрин, разлагает его на полипептиды, обладающие резкими антитромбиновыми свойствами (24). Поэтому повышенная активность плазмина может являться причиной геморрагического диатеза. Если плазмин лишен специфического действия по отношению к определенному соединению (разлагает в одинаковой степени фибрин, фибриноген, фактор V и так далее), и с другой стороны антифибринолитическая активность плазмы делает невозможным проявление его фибрино- и тромболитического действия, то возникает вопрос, является ли вообще обоснованной активация эндогенной тромболитической системы.

Однако такая терапия возможна, и это вытекает из клинических наблюдений и экспериментальных данных. Оказалось, что одним из основных свойств плазминогена является его сильное сродство как к фибриногену, так и к фибрину (5, 13, 25). В сгустке, образующимся внутрисосудисто, концентрации плазминогена доходят до очень высокой степени в результате абсорбции его на фибриновой сетке. Освобождение под влиянием различных факторов эндогенного активатора плазмина обуславливает образование этого фермента не только в крови, но и прежде всего в сгустке. Плазмин, образовавшийся в крови, не имеет большого значения для коагуляции сгустка, так как подвергается быстрой инактивации циркулирующим антиплазмином. Существенное значение для растворения сгустка прежде всего имеет освобождение из сосудистой стенки эндогенного активатора плазминогена и увеличение его количества в циркулирующей крови. Последний проникает относительно легко (в отличие от ингибитора плазмина) внутрь сгустка, активируя адсорбированный плазминоген в плазмин, что в конечном итоге приводит к растворению сгустка. Из этого вытекает, что тромболитическое лечение может пойти в трех направлениях:

- а) по пути освобождения эндогенного активатора плазминогена;
- б) по пути введения в кровяное русло экзогенного плазмина;
- в) введения в кровяное русло активаторов плазминогена.

Освобождение эндогенного активатора плазминогена из тканей возможно при помощи факторов, указанных в схеме. Чаще всего с этой целью применяются бактериальные пирогенные вещества (9, 10, 11, 15, 16, 19, 23, 26, 33, 35, 36). Неприятные субъективные симптомы, сопутствующие введению

пирогенов, а также кратковременность усиленной тромболитической активности, большие индивидуальные различия в реакции на введение этих препаратов, невозможность точного контроля терапевтического эффекта, являются причиной того, что эта методика лечения тромбоэмболической болезни была оставлена.

В последнее время предприняты попытки лечения тромбозов и эмболий при помощи инфузии плазмина (3, 7, 28, 32). Имеющиеся в продаже растворы плазмина (Actase, Thrombolysin) оказались, однако, смесью плазмина и стрептокиназы. Для того, чтобы получить желаемый терапевтический эффект, доза вводимого фермента должна быть очень большой, так как антиплазминовая активность плазмы очень велика. Ввиду того, что протеолитическое действие плазмина не является специфическим только для фибрина, введение терапевтических доз перечисленных выше препаратов вызывает нежелательное разложение веществ, важных для свертывания крови, что в конце концов приводит к развитию геморрагического диатеза.

Недостаточный тромболитический эффект, который трудно предвидеть и регулировать как при применении препаратов, освобождающих эндогенный активатор пламиногена, так и самого плазмина, склонил ученых к поискам более надежных и легче регулируемых субстанций, непосредственно активирующих пламиноген. Такой субстанцией оказалась стрептокиназа (1, 12, 13, 14, 17, 21, 27). Путем постоянной инфузии этого фермента удалось добиться терапевтического уровня этого активатора пламиногена в крови. Ввиду того, что тромболитический эффект зависит прежде всего от количества активатора, проникающего внутрь сгустка, вначале казалось, что этот способ тромболитической терапии будет эффективным. Кроме того, регуляция терапевтического эффекта при этом способе лечения была бы более легкой. Однако практика показала, что пригодность этого способа тромболитического лечения не так велика. После инфузии стрептокиназы отмечались сильные температурные реакции, а также симптомы геморрагического диатеза. Последние, правда, можно было ликвидировать введением кортикостероидов. Однако не удалось полностью избежать пирогенных реакций, которые являлись результатом загрязнения стрептокиназы. Кроме того стрептокиназа, являясь белковой субстанцией, вызывает образование антител, что может иметь значение при необходимости повторения тромболитической терапии.

Бóльшие шансы, чем стрептокиназа, вероятно имеет другой активатор пламиногена, иммунологически неактивная уреаза, выделенная из мочи. Однако изучение этого препарата еще не вышло за стены экспериментальных центров (25).

Следует вспомнить еще о другом средстве, активирующем фибринолиз, полученном из определенного штамма *Aspergillus oryzae* и называемом аспергиллин О. Механизм действия его, однако, изучен недостаточно (22). До настоящего времени не имеется клинических данных об эффективности этого вещества при тромбоэмболиях.

Современное тромболитическое лечение еще очень несовершенно и связано с определенными опасностями. Поиски непирогенных и иммунологически неактивных активаторов пламиногена, а также точных методов определения и контроля достигнутого терапевтического эффекта продолжаются.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ablondi F. B., De Renzo E. C.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1959, 102, 717. — 2. Albrechtsen O. K.: Acta Physiol. Scand. 1959 Supp., 165. — 3. Ambrus J. L., Ambrus C. M., Back N., Sokal J. E., Collins G. L.: Ann N. Y. Acad. Scienc., 1957, 68, 97. — 4. Alkjaersig N., Fletcher A. P., Sherry S.: J. Biol. Chem., 1959, 234, 832. — 5. Alkjaersig N., Fletcher A. P., Sherry S.: J. Clin. Investig.,

- 1959, 38, 1086. — 6. Back N., Ambrus J. L., Simpson C. L., Shulman S.: J. Clin. Investig., 1958, 37, 864. — 7. Clifton E. E.: Annals N. Y. Acad. Scienc., 1957, 68, 209. — 8. Clifton E. E., Grossi C. F.: Surgery 1955, 37, 794. — 9. Cochran B., Whitney E. B., Ware A. G.: Pharmaceutica Acta Helvetiae., 1958, 33, 719. — 10. Eichenberger E.: Acta Neurovegetativa, 1955, 11, 1.
11. Eichenberger E., Schmidhauser-Kopp M., Hurni H., Ericson M., Westphal O.: Schw. Med. Woch., 1955, 85, 1190. — 12. Flecher A. P., Alkjaersig N., Sherry S.: J. Clin. Investig., 1959, 38, 1096. — 13. Fletcher A. P., Sherry S.: Circulation 1960, 22, 619. — 14. Fletcher A. P., Sherry S., Alkjaersig N., Smyrniotis F. E., Jick S.: J. Clin. Investig., 1959, 38, 1111. — 15. Hörder M. H., Kickhöfen B.: Acta Haematologica, 1957, 17, 321. — 16. Hörder M. H., Kickhöfen B., Wendt F.: Klin. Woch., 1958, 36, 164. — 17. Johnson A. J., Fletcher A. P., McCarty W. R., Tillett W. S.: Ann. N. Y. Acad. Scienc., 1957, 68, 201. — 18. Kline D. L., Fishman J. B.: Ann. N. Y. Acad. Scienc., 1957, 68, 25. — 19. Kokot F., Gonciarz Z.: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 685. — 20. Kowalski E., Latallo, Niewiarowski S.: Folia Haematologica, 1957, 75, 2.
21. Lo R., Mc Fadzean A. J. S.: Clin. Science 1958, 17, 499. — 22. Marin H. M., Stefanini M., Soardi F., Mueller L.: J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 47. — 23. Meneghini P.: Acta Haematologica, 1958, 19, 65. — 24. Niewiarowski S., Kowalski E.: Rev. Hématol., 1958, 13, 320. — 25. Sawyer W. D., Alkjaersig N., Fletcher A. P., Sherry S.: Arch. Int. Med., 1961, 107, 274. — 26. Schönholzer G., Eichenberger E.: Helvetica Med. Acta, 1956, 23, 641. — 27. Sherry S., Alkjaersig N.: Ann. N. Y. Acad. Scienc., 1957, 68, 52. — 28. Sherry S., Fletcher A. P.: Clin. Pharmacol. Therapeutics, 1960, 1, 202. — 29. Sherry S., Fletcher A. P., Alkjaersig N.: Physiol. Rev., 1959, 39, 343. — 30. Sherry S., Lindemeyer R. I., Fletcher A. P., Alkjaersig N.: J. Clin. Investig., 1959, 38, 810.
31. Sherry S., Titcher A., Gottesman L., Wasserman P., Troll W.: J. Clin. Investig., 1954, 33, 1303. — 32. Sokal J. E., Ambrus J. L., Ambrus C. M.: J. A. M. A., 1958, 168, 1314. — 33. Stamm H., Eichenberger E.: Geburtshilfe u. Frauenheilkunde, 1958, 18, 451. — 34. Tillett W. S., Sherry S.: J. Clin. Investig., 1949, 28, 173. — 35. Voit K., Tilling W.: Arztliche Woch., 1954, 9, 730. — 36. Von Kaulla K. N.: Circulation 1958, 17, 187. — 37. Weiner M., De Crinis K., Redisch W., Steele J. M.: Circulation 1959, 19, 845.

ДРУГИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ

Коллагеназа (кlostридиопептидаза А), фермент бактериального происхождения, обладает особенно сильным протеолитическим действием по отношению к коллагеновым волокнам соединительной ткани. Некоторые авторы рекомендуют применять ее при лечении ожогов.

Также препарат „Дебрицин“, лиофилизированная протеаза из фигового дерева, специфически растворяет денатурированные коллагеновые волокна и фибрин. Имеются сообщения о положительных результатах применения этого препарата для очищения ран (1, 2).

Папаин (1), протеолитический фермент растительного происхождения (из *carica papaya*) введен для лечения некротических ран еще в прошлом веке. В настоящее время папаин уже не применяется с этой целью, но имеются сообщения об эффективности его в борьбе с гельминтозами (*ascaris lumbricoides*, *oxyuris vermicularis*, *trichuris trichiura*). Наилучшие результаты получены при одновременном применении солей магния и пиперазина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Connell J. F., Rousselot L. M.: Amer. J. Surg., 1959, 98, 685. — 2. Rob Ch., Singer A.: Brit. Med. J., 1959, 2, 1069.

ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗА

Дезоксирибонуклеаза (дорназа) деполимеризует дезоксирибонуклеопротеиды до мононуклеотидов. Наряду со стрептодорназой, получаемой из культур стрептококков, в терапии используется также фермент, получаемый из поджелудочной железы. Терапевтическое действие заключается в разложении нуклеопротеидов, входящих в состав клеточного ядра. Благодаря этому наступает разжижение густого, а особенно гнойного отделяемого, что облегчает его удаление. На слизистое отделяемое этот фермент почти не действует (3).

Дорназу применяют для ингаляций в качестве аэрозолей при гнойных бронхитах, бронхоэктазиях, бронхиальной астме, нерассасывающихся пневмониях с длительным течением, при абсцессах и ателектазах легких. Способность дорназы, принятой парентерально, проникать в мочу, использовано при лечении некоторых гнойных воспалительных процессов мочевых путей. Введенная внутривенно, дорназа может оказать услуги при лечении абсцессов легких. Этот фермент применяется также субменингеально при менингитах. Имеются сообщения о положительных результатах применения дорназы и рибонуклеазы при экспериментальных новообразованиях у животных. Производятся клинические исследования возможности использования этих ферментов для лечения лейкозов (1, 2).

Дорназа не обладает токсическим побочным действием, не раздражает также слизистых оболочек. Описаны лишь появляющиеся иногда аллергические симптомы, и даже анафилактический шок. Противопоказаний к применению дорназы нет. У больных с аллергическими заболеваниями перед применением фермента целесообразно производить внутрикожные пробы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Aleksandrowicz J.: Haematologica Cracoviensia, 1958, 179, 1. — 2. Aleksandrowicz J., Ostrowska A., Urbanczyk J., Sierko J.: Haematologica Cracoviensia, 1958, 2, 159. — 3. Armstrong J. B., Whitt J. C.: Lancet; 1950, 2, 739.

СТРЕПТОКИНАЗА И СТРЕПТОДОРНАЗА

Стрептокиназа является ферментом, продуцируемым стрептококками. Те же самые микробы вырабатывают дезоксирибонуклеазу, называемую стрептодорназой. Стрептокиназа является одним из лучше всего изученных активаторов пламиногена (смотри главу о плазмине). В результате активации пламиноген переходит в сильный протеолитический фермент, называемый плазмином. Последний обладает способностью растворять фибринную сетку сгустка крови. Из этого вытекает, что фибрино- и тромболитическое действие стрептокиназы является косвенным.

Стрептодорназа является дезоксирибонуклеазой, сходной по своему действию с ферментом того же названия, продуцируемым поджелудочной железой. Эти обе дезоксирибонуклеазы обладают сходными биохимическими свойствами, однако различны с точки зрения иммунологии. Стрептодорназа деполимеризует дезоксирибонуклеиновые кислоты, но только в тех случаях, когда эти кислоты окажутся за пределами клетки. Этот фермент не действует на дезоксирибонуклеиновые кислоты неповрежденных клеток.

Вопрос применения стрептокиназы в терапии у людей рассмотрен в главе о плазмине. Кроме тромболитических заболеваний этот фермент применяется местно вместе со стрептодорназой для растворения гематом различной локализации. Основным показанием к применению этого фермента являются осумкованные абсцессы. Этот фермент, деполимеризующий дезоксирибонуклеиновые кислоты распавших лейкоцитов, в значительной степени разжижает гной, облегчая его аспирацию и удаление.

При местном (в полости тела) применении стрептокиназы или стрептодорназы следует всегда помнить об удалении растворенной крови или гноя через некоторое время (от нескольких до 20 часов) после введения фермента. Если не придерживаться этого правила, то фермент и продукты его деятельности всасываются в кровяное русло, что может привести к целому ряду побочных симптомов.

Эти ферменты, введенные парэнтерально в хорошо очищенном виде, вызывают образование специфических антител, наличие которых может свестись к нулю терапевтический эффект, особенно стрептокиназы, вводимой внутривенно с тромболитической целью.

Применение этих ферментов не лишено побочного действия. О расстройствах в системе свертывания крови, наблюдаемых после применения стрептокиназы, речь была в главе о плазмине.

Также и местному применению этих ферментов часто сопутствуют боли, повышение температуры, общая разбитость, а иногда даже симптомы сосудистой недостаточности. Это скорее результат действия не самих ферментов, а их загрязнения. Относительная частота проявления побочных симптомов при применении этих ферментов привела к тому, что они применяются все реже. Введение препаратов высокой степени чистоты и одновременно большой биологической активности возможно вернет этим ферментам положенное им место в терапии.

ГИАЛУРОНАТ-ЛИАЗА

Гиалуронидаза (гиалуронат-лиаза) является ферментом, деполимеризующим мукополисахариды, которые в соединении с белками составляют межклеточную субстанцию. Под влиянием этого фермента увеличивается проницаемость тканей и сосудистых стенок. Изменяется также способность связывания воды межклеточной соединительной тканью.

Это действие гиалуронат-лиазы используется прежде всего в педиатрии при подкожных вливаниях. При применении гиалуронат-лиазы этим вливаниям не сопутствует появление болезненных отеков, скорость всасывания введенных жидкостей значительно увеличивается. Эти вливания с успехом могут заменить внутривенные. Они не связаны с опасностью образования тромбов в просвете вен.

Гиалуронат-лиаза применяется также для облегчения всасывания лекарственных препаратов, вводимых в виде подкожных и внутримышечных инъекций. Кроме уменьшения болей, таким образом добиваются более быстрого проникновения препарата в сосудистое русло и тем самым более сильного его действия. Применяя гиалуронат-лиазу при местном и проводниковом обезболивании, значительно сокращают время, необходимое для появления анестезии и увеличивают область обезболивания.

При обезболивании гиалуронат-лиаза нашла особенно широкое применение в окулистике. Таким образом можно избежать инфильтрации анестезирующей жидкостью мышц глазного яблока, предотвратить отеки и ускорить всасывание гематом.

Охотно применяют гиалуронат-лиазу для обезбоживания в ларингологии.

В исключительных случаях, при отсутствии доступных вен, можно даже произвести урографию, вводя контрастное вещество вместе с гиалуронат-лиазой подкожно или внутримышечно.

Также и лекарственные препараты, применяемые местно, под влиянием этого фермента быстрее проникают к месту своего действия, например, в гинекологии, при лечении эрозий с воспалительных процессов в шейке матки (4).

Лекарства, применяемые в виде аэрозолей, действуют более эффективно, если их давать вместе с гиалуронат-лиазой. При менингитах этот фермент используется для облегчения проникновения антибиотиков.

Гиалуронат-лиаза оказалась пригодной в лечении отеков, особенно местных, и кровоизлияний. Примером является применение гиалуронат-лиазы при

лечения аллергических и посттравматических отеков, подкожных и внутрисуставных кровоизлияний (например при гемофилии) (1) и других. Этот фермент применялся также в терапии эмпием плевральной полости и гнойных свищей. При эмпиемах положительные результаты получены лишь при раннем применении препарата, когда еще не дошло до цирротических изменений в легких и сужений бронхов (2). „Расслабляющее“ действие на межклеточную субстанцию некоторые авторы пытались использовать при лечении склеродермии, прогрессирующих артритов, „*periarthritus humero-scapularis*“. Результаты, приведенные в литературе, довольно разноречивы. Также противоречивы сообщения о возможности замедления камнеобразования при мочекаменной болезни. Подкожное применение гиалуронат-лиазы при этой нозологической форме вероятно увеличивает дисперсность коллоидов мочи (3). Следует также напомнить об исследованиях действия гиалуронат-лиазы при склерозе венечных сосудов (5).

Гиалуронат-лиаза обычно не дает побочных явлений. При более длительном применении в организме вырабатываются антитела, которые могут свести на нет ее действие. В качестве осложнения описаны аллергические симптомы, которые появляются в результате сенсибилизации к ферменту, а также бурная генерализация гнойного процесса после применения этого фермента, даже до появления сепсиса с летальным исходом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ausland W. R., Gartland J. J.: N. Engl. J. Med., 1952, 247, 755. — 2. Bross W., Garbiński T.: Schw. Med. Wschr., 1955, 85, 774. — 3. Butt A. J., Hauser E. A., Traina V.: Presse Méd., 1952, 60, 106. — 4. Gołąb H., Rudkowska J., Szachowska M.: Ginek. Polska, 1959, 30, 663. — 5. Zankiewicz W., Boroń P.: Pol. Arch. Med. Wewn., 1960, 30, 1185.

ПЕНИЦИЛЛИНАЗА

Пенициллиназу вырабатывают некоторые микробы (*Escherichia coli*, некоторые штаммы стафилококков). Ее действие, инактивирующее пенициллин, заключается в гидролизе лактамового кольца. Полученный продукт не обладает антигенными свойствами пенициллина. Вначале пенициллиназой пользовались в микробиологических лабораториях для гидролиза следов пенициллина в тканевых жидкостях, применяемых для разведения бактерий. Исследования *in vitro* показали, что под влиянием этого фермента пенициллин исчезает из циркулирующей крови в течение 30—60 минут. Действие отдельной дозы пенициллина длится от 4 до 7 дней. Пенициллиназа оказалась ценным средством при лечении аллергических реакций на пенициллин. Аллергические симптомы в большинстве случаев исчезают в течение 24—48 часов. Более быстрый эффект можно получить при одновременном применении гормонов коры надпочечников.

Иногда после инъекции пенициллиназы наступает местная болезненность. В редких случаях наблюдается повышение температуры и ознобы. Лишь в исключительных случаях могут появиться более серьезные симптомы сенсибилизации к препарату. Не исключено, что они вызваны загрязнением фермента.

Производились попытки использования с терапевтической целью некоторых других ферментов: церулоплазмина (при болезни Вильсона), ацетилхолинэстеразы, холинэстеразы и уреазы (для разложения избытка мочевины, образующейся при лечении лейкозов). Однако эти ферменты не нашли широкого клинического применения.

ИНГИБИТОРЫ АЦЕТИЛХОЛИН- И ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Давно известными ингибиторами этих ферментов являются физостигмин и простигмин. Эти алкалоиды действуют конкурентивно по отношению к ацетилхолину. Торможение ацетилхолинэстеразы клинически проявляется, как известно, симптомами ваготонии. Действие этих алкалоидов обратимо.

В последние годы в продаже появился целый ряд сильно действующих инсектицидных препаратов, которые являются эфирами фосфорной кислоты. Эти соединения, широко применяемые в борьбе с вредителями фруктовых деревьев, очень часто могут являться причиной случайного или умышленного отравления. Они входят в прочную связь с названными выше ферментами, что делает невозможным разложение ацетилхолина. Только систематический контроль активности холинэстеразы в крови у людей, имеющих профессиональный контакт с этими соединениями, может предохранить их от часто необратимых результатов отравления.

Отравление ингибиторами холинэстеразы лечат при помощи атропина, артана, парпанита и тритидиона. В последние годы введен сильный антидот при отравлении эфирами фосфорной кислоты, называемый сокращенно Р.А.М. (йодоксим N метил-пиколлин-альдегида). Следует отметить что большое количество боевых отравляющих веществ относится к ингибиторам холинэстеразы.

ИНГИБИТОРЫ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Кроме частых в клинике тромбозмболических болезней, характеризующихся усиленной свертываемостью крови, встречаются также противоположные состояния, чаще всего вызванные гиперплазмиемией. Активация плазминогена разными, лучше или хуже изученными факторами, приводит к появлению сильно протеолитически действующего фермента — пламина, разлагающего фибриноген и другие факторы свертывания крови. В результате дело доходит до резкого снижения свертываемости крови, что является частой причиной обескровливания больных. Такие состояния особенно часто наблюдаются после операций на матке, предстательной железе, печени, поджелудочной железе и легких.

В последнее время появились препараты, эффективно тормозящие активность пламина. К ним относится ϵ -аминокапроновая кислота, а также полипептид, полученный из ткани поджелудочной железы, который в продаже называется фактором Kunitz и Northrop (Iniprol).

ϵ -аминокапроновая кислота является синтетическим ингибитором, тормозящим активацию плазминогена в плазме под влиянием таких факторов, как стрептокиназа и уреазы. Она тормозит также активацию эндогенной фибринолитической системы, вызванную применением пирогенов или никотиновой кислоты. В более высоких концентрациях тормозит вероятно и пламин (4).

Этот препарат, вводимый в больших дозах (до 8 г в сутки внутривенно) больным после простатэктомии, уменьшает в 4 раза послеоперационную кровопотерю. Происходит это в результате торможения уреазы, которая у этой группы послеоперационных больных способствует кровотечению из раны.

Фактор Kunitz и Northrop является полипептидом с молекулярной массой примерно 6000. В поджелудочной железе он связан с трипсином и химотрипсином. Активация этих ферментов вероятно заключается в отщеплении названного выше фактора. Ингибитор этот тормозит не только активацию пламина, но также трипсина и химотрипсина. Отсюда и применение его при гиперплазмиемии (2, 3, 5), как и при гиперэнзимии, встречаемой при

острых панкреатитах. При этих последних он вероятно является лекарством выбора.

В настоящее время еще точно не известно, в какой степени ингибитор Kunitz сходен с трасилолом (Bayer) (1). Последний является очень сильным ингибитором как трипсина, так и калликреина и применяется при ферментной интоксикации, которая имеет место при острых панкреатитах. Возможно, что имеющийся в продаже трасилол и шипрол являются одними и теми же субстанциями.

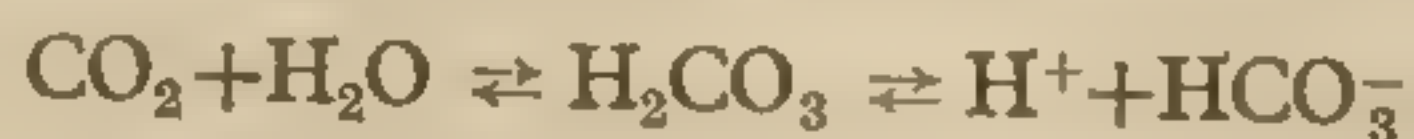
ЛИТЕРАТУРА

1. Hafter E.: Gastroenterologia, 1961, 95, 60. — 2. Lande M., Vergoz D., Leger L.: Presse Méd., 1960, 68, 1255. — 3. Levy J., Parent B., Nicolas A., Merger R.: Presse Méd., 1961, 69, 849. — 4. Mc Nicol G. P., Fletcher A. P., Alkjaersig N., Sherry S.: J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 34. — 5. Vergoz D., Lande M., Leger L.: Presse Méd., 1961, 69, 339.

ИНГИБИТОРЫ КАРБОАНГИДРАЗЫ

Карбоангидраза является ферментом с молекулярной массой примерно 30000, содержащим в своей молекуле цинк. Главной задачей этого фермента в организме является катализ реакции связывания CO_2 в тканях и выделение CO_2 в легких. В почках этот фермент играет основную роль в процессе реабсорбции натрия в почечных канальцах. Роль этого фермента в продукции желудочной кислотности и в удалении бикарбонатов с панкреатическим соком окончательно не изучена. Также мало изучено значение карбоангидразы в регуляции возбудимости центральной нервной системы.

Карбоангидраза катализирует следующую реакцию:



В зависимости от условий среды равновесие может быть смещено в ту или другую сторону.

Сильными ингибиторами этого фермента оказались субстанции, обладающие свободной сульфамидной группой. К наиболее сильным ингибиторам, одновременно почти полностью лишенным токсического действия (если их принять в терапевтических дозах) относится ацетазоламид (диамокс, диурамид). Это соединение, хотя и является сульфонамидом, не обладает противобактериальными свойствами. Механизм его действия на уровне почек представлен на схеме, приведенной в главе о ферментологии почек. Это соединение, тормозя образование H_2CO_3 и следовательно ионов H^+ и HCO_3^- , делает невозможным замену водородного иона на натрий, содержащийся в канальцевой жидкости. Одновременно уменьшается образование аммиака, что вытекает из другой схемы, приведенной в той же главе, которая представляет выделение этого соединения с мочой. Расстройство резорбции натрия приводит к увеличению диуреза (осмотический диурез). Моча, в результате усиленного выделения дифосфатов и бикарбоната натрия, алкализирована, а в крови увеличивается концентрация водородных ионов, что приводит к метаболическому ацидозу. Этот последний является антагонистом диуретического действия диамокса, исчерпывая таким образом диуретические свойства этого соединения. Это соединение не оказывает практически никакого влияния на выделение ионов хлора и кальция, аминокислот и глюкозы (у диабетиков). Заслуживает внимания также калиуретическое действие диамокса. Оно может быть результатом самого процесса ацидоза, или же реактивного увеличения секреции альдостерона (физиологическая реакция организма на потерю натрия).

Перечис
в разных
лечения о
ного прои
тических
действие
Пример
введении
ности воз
менение д
при легоч
Ингибит
и эпилепс
ящего вре
Ингибит
лечения п
дозы оказа
В отлич
боангидраз
125 больн
переносимо
жение хрон

1. Gailitis I

Аминокси
пространен
здорового и
налина, нор
Исследова
после введе
и ингибитор
нервную си
чилось. Сред
(1-бензол-2-н
-карбони-гид
зил-карбамид
Фармако
один из изве
фермента из
пестический
ния на други
резко усилив
увеличиваетс
этих препарат
ния этих пре
линэстеразы
Клиничес
биторов MAO

Перечисленные свойства этого соединения определяют его применение в разных отраслях медицины. Этот препарат чаще всего применяется при лечении отеков разного происхождения, наиболее успешно при отеках сердечных препаратов, так как он, вызывая метаболический ацидоз, усиливает действие ртутных диуретиков и уменьшает их гипохлоремизирующий эффект.

Применение диамокса при печеночных отеках нуждается в дополнительном введении бикарбоната калия и тщательном врачебном контроле, ввиду опасности возникновения коматозного состояния. Наименее эффективно при применении диамокса при нефрозах. Иногда этот препарат с успехом применяется при легочно-сердечном синдроме (уменьшает существующую гиперкапнию).

Ингибиторы карбоангидразы нашли также применение в терапии глаукомы и эпилепсии. Однако механизм их действия при этих заболеваниях до настоящего времени не выяснен.

Ингибиторы карбоангидразы до сих пор не нашли широкого применения при лечении повышенной кислотности, так как необходимые терапевтические дозы оказались высоко токсическими.

В отличие от всеобщего мнения о неэффективности ингибиторов карбоангидразы в терапии язвенной болезни Gailitis и Schreiber (1), давая диамокс 125 больным с язвенной болезнью, наблюдали преимущественно хорошую переносимость и улучшение в большей части случаев, несмотря на обнаружение хронического метаболического ацидоза у всех больных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gailitis R. J., Schreiber W.: Am. J. Dig. Dis., 1960, 5, 473.

ИНГИБИТОРЫ МОНОАМИНОКСИДАЗЫ (МАО)

Аминоксидаза является сложным ферментным комплексом, широко распространенным в организме. Ей приписывается важная роль в организме здорового и больного человека. Этот фермент тесно связан с обменом адреналина, норадреналина и серотонина.

Исследование субстанций, тормозящих активность этого фермента, началось после введения в терапию ипрониазида. Замечено, что этот туберкулостатик и ингибитор МАО отличается возбуждающим действием на центральную нервную систему. Вскоре число известных ингибиторов МАО резко увеличилось. Среди них следует назвать указанный уже выше ипрониазид, терсавид (1-бензол-2-пивалоил-гидразин), марплан (1-бензил-2-/5-метил-3-изоксазол-ил-карбони-гидразин), катрон (α -метил-фенетил-гидразин), ниламид (1-/2-бензил-карбамил-/этил-/2-изоникотиноил-гидразин) и нардил.

Фармакологические свойства (8, 7). Следует подчеркнуть, что ни один из известных до настоящего времени ингибиторов МАО не тормозит этого фермента избирательно. Отсюда возникает сомнение, является ли их терапевтический эффект результатом торможения МАО, или же результатом влияния на другие ферментные системы. Применение этой субстанции у животных резко усиливает их возбудимость. При этом в центральной нервной системе увеличивается концентрация НАД. У некоторых животных при применении этих препаратов увеличивается использование пиридоксина. Во время введения этих препаратов замечено также падение активности МАО и псевдохолинэстеразы в сыворотке и рост активности трансаминаз.

Клиническое исследование. Наиболее знаменательной чертой ингибиторов МАО является их возбуждающее влияние на центральную нервную

систему, особенно заметное в психомоторной сфере. Однако очень часто этот эффект проявляется лишь после нескольких дней бессимптомного течения. Следует подчеркнуть также симпатиколитический эффект (ортостатическая гипотония, исчезновение потливости рук, увеличение температуры конечностей, расстройства мочеотделения) а также синергическое действие по отношению к анестезирующим средствам, барбитуратам, кортикоидам, ганглиоплегикам, морфину, атропину и противомаларийным средствам, применяемым при ревматических заболеваниях. Хлоротиазид и гидрохлоротиазид усиливают антидепрессивное и гипотензионное действие ингибиторов МАО.

Клинические показания к применению ингибиторов МАО. Наиболее широко распространено применение ингибиторов МАО при стенокардии (4, 6, 7, 8, 9). Хотя результаты разных авторов очень различны (некоторые считают, что эти препараты не имеют никакого терапевтического значения 1, 3, 5), нам кажется, что в определенном проценте случаев при лечении этими лекарственными веществами можно достигнуть положительного терапевтического эффекта. Однако применение ингибиторов МАО у больных со стенокардией таит в себе большие опасности. Во-первых эти лекарства, усиливая психомоторную активность (что в данной группе больных по крайней мере нежелательно), углубляют вторичную гипоксию сердечной мышцы и могут даже спровоцировать появление инфаркта миокарда. Такой инфаркт тем более опасен, что может протекать безболезненно, так как ингибиторы МАО уменьшают интенсивность венечных болей. Кроме того эти лекарства, по крайней мере некоторые из них, повышая активность трансаминазы в сыворотке крови (7), могут увеличить диагностические трудности у тех больных, у которых кроме повышения активности трансаминазы другие клинические симптомы инфаркта отсутствуют. Увеличение активности трансаминаз в сыворотке вероятно является результатом токсического действия этих препаратов на печень.

Кроме кардиологии ингибиторы МАО применяют вместе с другими лекарственными веществами там, где основным патологическим симптомом является боль. Описано положительное действие этих ингибиторов при лечении ревматических болей, опухолевых, родовых, послеоперационных и так далее, при сочетании лечения с другими анальгетиками (8, 9). Кроме анальгетического действия ингибиторы МАО обладают выраженным психотропным действием. В неврологической и психиатрической литературе имеются сообщения о положительном действии их при депрессивных состояниях (эндогенных и реактивных) (2, 8). Третьей областью их действия являются аллергические заболевания, такие как: *dermatitis allergica*, *asthma bronchiale allergicum* и так далее (8). Известны также положительные результаты применения этих средств при различных других дерматозах.

Наконец, напомним еще о местном применении ингибиторов МАО при трофических и послеожоговых изъязвлениях, и язвенном колите (8).

Симптомы побочного действия: кроме указанных выше симпатиколитических симптомов, ингибиторы МАО обладают также токсическим действием на некоторые паренхиматозные органы, особенно на печень и на гемопозитическую систему.

Наши сведения об ингибиторах МАО еще неполны. Будущее покажет, какое место эти препараты займут в повседневной клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allanby K. D., Cox A. G. C., Mclean K. S., Price T. M. L., Southwell N.: Lancet; 1961, 1, 138. — 2. Crips A. H., Hays P., Carter A.: Lancet; 1961, 1, 17. — 3. Editorial: Lancet; 1961, 1, 150. — 4. Lundberg A., Sjöberg H. E.: Acta Medica Scand., 1961, 169, 351. — 5. Murphy F.,

Barber J. M., Kilpatrick S. J.: Lancet; 1961, 1, 139. — 6. Noskiewicz A.: Kardiologia Polska, 1959, 2, 135. — 7. Scherbel A. L.: Arch. Int. Med., 1961, 107, 37. — 8. Streszczenie referatów: Międzynarodowe Sympozjum o Nialamidzie Lizbona 12—14. XI. 1959 r. — 9. Trojanowski A., Plewiński G.: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 530.

ИНГИБИТОРЫ КОФЕРМЕНТА А

Среди изученных до настоящего времени ингибиторов кофермента А только немногие нашли применение в клинической терапии. К ним относятся прежде всего α -фенилмасляная кислота и ее амид (гипостерол, артосклерол) (2). Эта субстанция, при длительном ее применении, снижает уровень холестерина в крови у людей и животных, причем падение это тем больше, чем более высокой была исходная концентрация холестерина. До сих пор не выяснено, на каком уровне синтеза холестерина вмешивается этот ингибитор, и принимает ли кофермент А участие в синтезе холестерина в этой стадии. Как известно, кофермент А занимает центральное положение в промежуточном обмене жиров, углеводов и белков (3). При длительном применении гипостерола обнаружено лишь снижение уровня холестерина, что свидетельствует также об избирательном действии этого соединения на холестериногенез. Интересное наблюдение приводят Masalski и Migdalska (1). Через несколько дней применения α -фенилмасляной кислоты отмечается падение выделения с мочой 17-гидроксистероидов, причем выделение 17-кетостероидов не изменяется. Это наблюдение могло бы свидетельствовать о вмешательстве этого соединения в кортикоидогенез, исходящий из уксусной кислоты или холестерина. Нельзя также не отметить того факта, что другие авторы не отмечали действия этой субстанции на обмен холестерина (2). Ингибиторы кофермента А, инактивирующие сульфгидрильную группу цистеина (цистеамин входит в состав кофермента А), не нашли практического применения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Masalski W., Migdalska B.: Pol. Tyg. Lek., 1961, 16, 861. — 2. Supniewski J.: Pol. Tyg. Lek., 1960, 15, 844. — 3. Wieland O.: Zschr. f. Vit.-Horm.-Ferment-forschung. 1957/58, 9, 258.

ЦИТОХРОМ С

Из 6 цитохромов, имеющих в организме людей и животных, до настоящего времени удалось получить в кристаллическом виде только цитохром С. Это низкомолекулярный белок с молекулярной массой примерно 13000. Антигенными свойствами он не обладает.

Производились попытки применять цитохром С при различных состояниях гипоксии. В начальном периоде изучения этого цитохрома как экспериментальные работы на животных, так и клинические наблюдения казалось бы свидетельствовали о том, что цитохром обладает существенным терапевтическим действием при некоторых заболеваниях. В последнее время все чаще раздаются критические голоса, отказывающие ему это первоначально приписываемое значение. В клинике пробовали применять цитохром при многих заболеваниях: при декомпенсированных пороках сердца, перикардитах, коронарной недостаточности, коллапсах, эмфиземе легких, отравлениях окисью углерода и барбитуратами, *dementia atherosclerotica*. Отдельные сообщения касаются: перемежающейся хромоты, прогрессирующей мышечной атрофии, латерального амиотрофического склероза, „*myasthenia gravis*“. В отдельных случаях разные авторы получили противоречивые результаты, или же приведенные ими данные о благоприятном влиянии препарата недостаточно удо-

кументированы. При экспериментальном отравлении СО и при одновременном введении цитохрома С обнаружен рост дыхательного обмена, а также отсутствие падения щелочного резерва крови. Терапевтическое действие препарата, как нам кажется, сомнительно.

Также первоначальные наблюдения, указывавшие на то, что цитохром С, введенный внутривенно, проникает в клетки, не подтвердились при применении радиоактивных изотопов. Лишь при повреждении клеточных оболочек он в ограниченном количестве может проникать внутрь их.

Цитохром С не обладает побочным действием. Лишь в исключительных случаях можно встретиться с повышенной чувствительностью к нему.

СОДЕРЖАНИЕ

Первая часть

Общие сведения из области химии — Проф. др. <i>Tadeusz Baranowski</i>	7
Ферменты	7
Химическое строение ферментов	7
Белковые свойства ферментов	7
Простетические группы ферментов	14
Коферменты	16
Техника изолирования и исследования ферментов	35
Кинетика ферментативных реакций	41
Основные понятия кинетики	41
Зависимость скорости ферментативных реакций от концентрации субстрата	43
Влияние ингибиторов на скорость ферментативной реакции	49
Влияние pH на активность ферментов	53
Влияние температуры на скорость ферментативной реакции	57
Структурная и пространственная специфичность ферментов	60
Классификация и номенклатура ферментов	64
Механизм действия ферментов	81
Молекулярный принцип ферментативной функции	81
Термодинамика ферментативных реакций	85
Ингибиторы и активаторы ферментов	93
Внутриклеточная топография ферментов	98
Регуляция и контроль ферментативной активности	101
Генетическая регуляция активности ферментов	105
Промежуточный обмен веществ	109
Обмен белков и аминокислот	109
Биосинтез белка	110
Распад белка	111
Обмен аминокислот	111
Обмен одноуглеродных фрагментов	113
Цикл мочевины	115
Обмен нуклеиновых кислот	116
Биосинтез нуклеиновых кислот	116
Распад нуклеиновых кислот	117
Биосинтез пуриновых нуклеотидов	118
Биосинтез пиримидиновых нуклеотидов	119
Обмен пиррольных пигментов	120
Синтез порфиринов	120
Распад железопорфиринов	122
Обмен жиров	122
Синтез жиров	122
Распад жиров	123
Синтез фосфатидов	126
Распад фосфатидов	126
Биосинтез холестерина	126

Обмен углеводов	127
Распад простых и сложных углеводов	127
Цикл лимонной кислоты (цикл трикарбоновых кислот)	128
Фосфорилирующий гликолиз	130
Цикл окисления глюкозо-6-фосфата (пентозо-фосфатный цикл)	132
Биосинтез простых и сложных углеводов	133
Биологические окисления	134
Цепь транспорта электронов	134
Пиридиновые ферменты и их роль	136
Флавиновые ферменты и их роль	136
Система, переносящая электроны (Warburg-Keilin)	137
Кислородные фосфорилирования	139
Фосфорилирования на уровне субстрата	140
Хранение и использование высокоэнергетических полифосфатов	141
Литература	143

Вторая часть

Физиологические свойства и методы определения некоторых ферментов	147
Общие принципы определения активности ферментов — Доц. др. мед. <i>Marian Orłowski</i>	147
Определение активности ферментов в сыворотке и биологических жидкостях	149
Определение активности ферментов в тканях	151
Физиологические свойства и способы определения активности некоторых ферментов — Доц. др. мед. <i>Marian Orłowski</i>	153
Ферменты углеводного обмена	153
Фосфоглюкомутаза (ФГМ)	153
Глюкозофосфатизомераза (ГФИ)	155
Альдолаза (АЛД)	158
Альдолаза фруктозо-1-фосфата	160
Глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (ГАФД)	161
Триозофосфат-изомераза	162
α -фосфоглицерол-дегидрогеназа, фермент <i>Baranowski</i> , глицерофосфат-дегидрогеназа (ГДГ)	163
Фосфоглицераткиназа	164
Фосфоглицеромутаза (ФГМ)	164
Фосфопироват-гидратаза (енолаза)	165
Пироваткиназа (ПК)	165
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	166
Методы определения активности ЛДГ в сыворотке	169
L-идитолдегидрогеназа — сорбитолдегидрогеназа (СДГ)	170
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа (Г-6-ФДГ)	171
Фосфоглюконатдегидрогеназа	171
Рибозофосфат-изомераза (РФИ)	172
Транскетолаза (ТК)	173
Амилаза (Ам)	175
Мурамидаза — лизоцим	178
Гиалуронидаза — гиалуронат-лиаза (ГР)	179
β -глюкуронидаза	182
Литература	185
Ферменты цикла лимонной кислоты (цикла Кребса) — Доц. др. мед. <i>Marian Orłowski</i>	188
Изоцитратдегидрогеназа (ИЦД)	188

Малатдегидрогеназа (МДГ)	189
Литература	190
Ферменты белкового и аминокислотного обмена — Проф. др. мед. <i>Kornel Gibiński</i>	190
Протеолитические ферменты	190
Пепсин	192
Трипсин и химотрипсин	193
Ренин	196
Протеиназы свертывания крови	196
Литература	198
Пептидазы — Доц. др. мед. <i>Marian Orlowski</i>	198
Карбоксипептидаза (КБП)	199
Лейциламинопептидаза (ЛАП)	200
Аминотрипептидаза	203
Глицил-глицил-дипептидаза	203
Глицил-L-лейцил-дипептидаза	204
Иминодипептидаза — пролиназа	204
Имидодипептидаза — пролидаза	204
Окситоциназа (ОТЦ)	204
γ -глутамил-транспептидаза (ГГТП)	206
Методы определения активности пептидаз	208
Литература	214
Трансаминазы (аминоферазы) и другие ферменты обмена аминокислот — Проф. др. мед. <i>Kornel Gibiński</i>	215
Методы определения трансаминаз	219
Ферменты орнитинового цикла	221
Литература	223
Оксидазы и оксидо-редукционные системы — Др. мед. <i>Stanisław Nowak</i>	224
Литература	230
Фосфатазы — Доц. др. мед. <i>Marian Orlowski</i>	230
Общие замечания	230
Щелочная фосфатаза	232
Кислая фосфатаза (Фк)	234
5-нуклеотидаза	235
Фруктозо-1,6-дифосфатаза — гексозодифосфатаза	236
Глюкозо-6-фосфатаза	236
Методы определения активности фосфатаз	236
Литература	241
Ферменты, гидролизующие эфиры карбоновых кислот — Доц. др. мед. <i>Marian Orlowski</i>	242
Общие замечания	242
Холинэстераза (Хэ)	244
Липаза поджелудочной железы (Лп)	248
Алиэстеразы — Карбоксилэстераза	249
Липопротеин-липаза (СФ)	249
Холестеролэстераза (ЭХ)	250
Фосфолипаза А (ФЛп-А)	251
Методы определения активности холинэстеразы	251
Методы определения активности панкреатической липазы	254
Литература	257
Ферменты обмена нуклеиновых кислот — Доц. др. мед. <i>Marian Orlowski</i>	259
Рибонуклеаза (РН-аза)	259
Определение активности рибонуклеазы	260

Дезокси-рибонуклеаза (ДН-аза)	261
Определение активности дезокси-рибонуклеазы	262
Литература	263
Другие ферменты — Доц. др. мед. <i>Marian Orłowski</i>	263
Аденозиндезаминаза (АД)	263
Карбоангидраза (КА)	264
Каталаза (КТ)	266
Глутатионредуктаза (ГР)	267
Сульфатазы	268
Литература	269

Третья часть

Патофизиология и клиника ферментативных расстройств	271
Роль и значение ферментологии в клинике — Проф. др. мед. <i>Kornel Gibiński</i>	271
Заболевания системы кровообращения — Проф. др. мед. <i>Edward Szczeklik</i>	272
Биохимия сердечной мышцы	272
Нормальный обмен веществ в сердечной мышце	272
Расстройства обмена веществ в сердечной мышце	277
Аритмия и электролиты	281
Артериосклероз	282
Гуморальный синдром артериосклероза	282
Расстройства метаболизма сосудистой стенки	290
Артериальная гипертония	291
Инфаркт миокарда	295
Литература	308
Заболевания органов пищеварения — Проф. др. мед. <i>Kornel Gibiński</i>	310
Желудок	310
Печень	315
Поджелудочная железа	340
Литература	344
Заболевания органов кроветворения — Проф. др. мед. <i>Edward Szczeklik</i> и др. мед. <i>Alina Janiakowa</i>	346
Ферментные расстройства эритроцитарной системы	346
Ферментные расстройства и изменения синтеза гемоглобина	346
Врожденные ферментные расстройства синтеза нормального гемоглобина, связанные с гемом	350
Ферментные расстройства эритроцитов	352
Ферментопатии эритроцитов	354
Гемолитические ферментопенические анемии	354
Ферментные расстройства системы белой крови	356
Ферментные расстройства тромбоцитов	359
Свертывание крови	360
Место фибринолитической системы в патогенезе кровотечений	366
Литература	367
Заболевания почек — Др. мед. <i>Franciszek Kokot</i>	368
Ферментология нефрона	368
Выделение аммиака и бикарбонатов с мочой	370
Ренин	371
Ферментные изменения крови при почечных заболеваниях	371
Выделение ферментов с мочой	372
Литература	374
Заболевания желез внутренней секреции — Др. мед. <i>Franciszek Kokot</i>	375

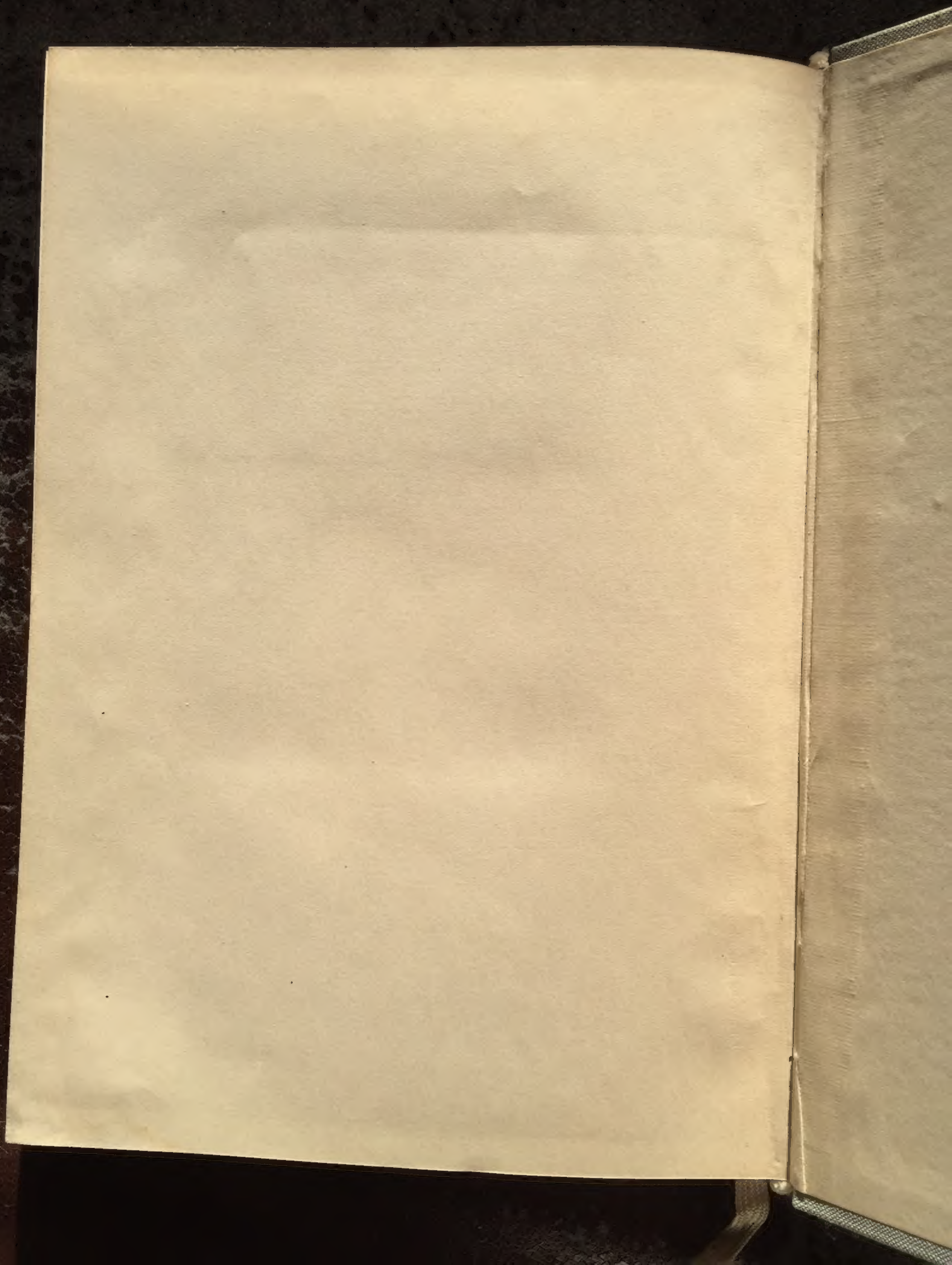
Внутрисекреторная система поджелудочной железы	375
Литература	378
Паращитовидные железы	378
Литература	379
Щитовидная железа	379
Литература	383
Надпочечники	384
Кора надпочечников	384
Мозговое вещество надпочечников	389
Литература	390
Предстательная железа	391
Литература	392
Заболевания соединительной ткани — Доц. др. мед. <i>Seweryn Łukasik</i>	392
Распространение соединительной ткани, ее состав и химическое строение	392
Микроструктура соединительной ткани	393
Физиологическая роль соединительной ткани	393
Патология соединительной ткани (коллагенозы, ревматизм)	394
Гиалуронатлиаза	395
Расстройства развития соединительной ткани	395
Литература	396
Заболевания костей — Доц. др. мед. <i>Seweryn Łukasik</i>	396
Состав, химическое строение и микроструктура кости	396
Биохимия окостенения	397
Активность щелочной фосфатазы сыворотки крови при заболеваниях костей	398
Расстройства развития костной ткани	399
Рахит	399
Остеомалация	400
Болезнь Paget (<i>osteitis deformans</i>)	400
Гиперфункция паращитовидных желез (болезнь Реклингаузена, <i>osteitis fibrosa cystica generalisata</i>)	400
Первичные злокачественные опухоли костей	401
Злокачественные метастатические опухоли костей	401
Литература	401
Заболевание скелетных мышц — Доц. др. мед. <i>Seweryn Łukasik</i>	401
Состав мышечной ткани	401
Микроструктура мышечных волокон	402
Биохимия мышечного сокращения	402
Методы ферментных анализов при заболеваниях мышц	403
Тканевые ферменты при заболеваниях мышц	403
Ферменты сыворотки крови при заболеваниях мышц	404
Литература	406
Злокачественные новообразования — Доц. др. мед. <i>Marian Orlowski</i>	406
Биохимия и ферментология опухолей	406
Вступительные замечания	406
Метаболизм опухолевой ткани и гипотеза Варбурга	406
Активность некоторых ферментов в опухолях и нормальных тканях	410
Гипотеза Greenstein	412
Некоторые признаки обмена злокачественных новообразований, связанные с ростом	413
Биохимические изменения в организме, отягощенном опухолью	415
Ферментные изменения в сыворотке при злокачественных новообразованиях	418
Щелочная фосфатаза (ЩФ)	419
Кислая фосфатаза (КФ)	420

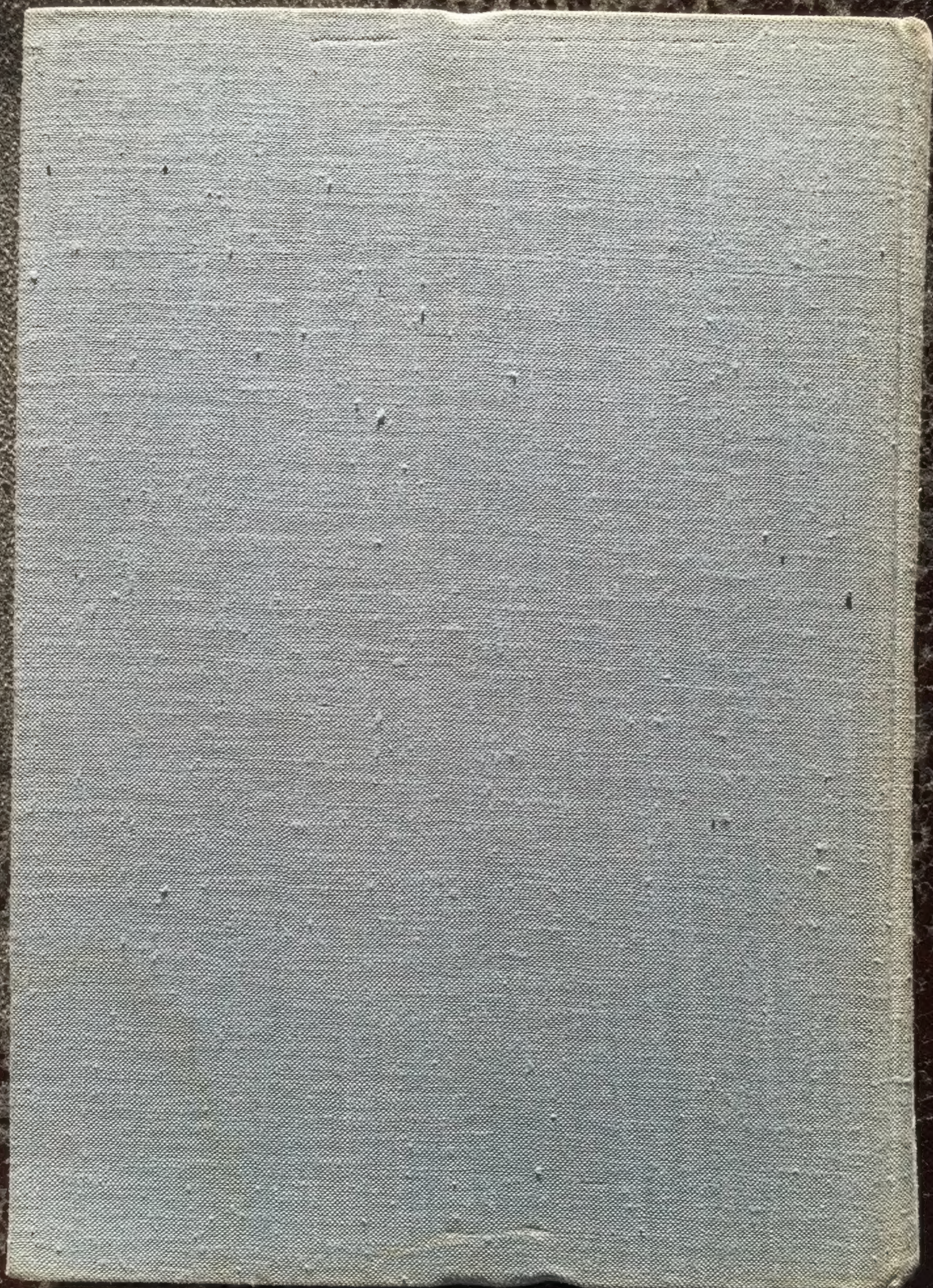
Альдолаза (АЛД)	421
Глюкозофосфат-изомераза (ГФИ)	422
Лактатдегидрогеназа (ЛДГ)	422
Аденозиндезаминаза (АД)	423
γ -глутамил-транспептидаза (ГГТП)	423
β -глюкуронидаза (β -ГР)	423
Другие ферменты	424
Литература	425
Другие заболевания — Др. мед. <i>Franciszek Kokot</i>	428
Аллергия	428
Литература	428
Ферментология в акушерстве	429
Ферментология нормальной беременности	429
Ферментология осложненной беременности	431
Различные ферменты в пуповинной крови	432
Литература	433
Врожденные ферментопатии — Доц. др. мед. <i>Kazimierz Spett</i>	434
Белковый обмен	436
Расстройства обмена фенилаланина и тирозина	436
Аминоацидурии	440
Синтез белков плазмы	441
Обмен сахаридов	443
Почечная глюкозурия	443
Фруктозурия	443
Пентозурия	444
Галактоземия и галактозурия	445
Гликогенозы	447
Жировой обмен	448
Липоидозы (тезауროзы)	449
Гиперлипемия и гиперхолестеринемия	451
Обмен гемопротеидов	452
Обмен порфиринов	452
Патологические формы гемоглобина	458
Метгемоглобинемия	459
Обмен желчных пигментов	460
Акаталазия	461
Пуриновый обмен	462
Другие редкие ферментопатии	464
Литература	464

Четвертая часть

Ферментотерапия — Др. мед. <i>Franciszek Kokot</i> и др. мед. <i>Stanisław Nowak</i>	467
Введение	467
Заместительная терапия при заболеваниях желудочно-кишечного тракта	469
Трипсин	469
Литература	471
α -Химотрипсин	471
Литература	471
Тромбин	471
Литература	472
Плазмин	472
Литература	474

Другие протеолитические ферменты	475
Литература	475
Дезоксирибонуклеаза	475
Литература	476
Стрептокиназа и стрептодорназа	476
Гиалуронат — лиаза	477
Литература	478
Пенициллиназа	478
Ингибиторы ацетилхолин- и холинэстеразы	479
Ингибиторы протеолитических ферментов	479
Литература	480
Ингибиторы карбоангидразы	480
Литература	481
Ингибиторы моноаминоксидазы (МАО)	481
Литература	482
Ингибиторы кофермента А	483
Литература	483
Цитохром С	483





STANFORD UNIVERSITY

LIBRARY

26